



Universitat de Girona

# CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA E BIOLÓGICA DE SCAFFOLDS PRODUZIDOS POR BIOCELL PRINTING

**Marco DOMINGOS**

**Dipòsit legal: Gi. 1626-2013**

<http://hdl.handle.net/10803/125471>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

TESIS DOCTORAL

Caracterización Mecánica y Biológica de  
Scaffolds producidos con tecnología de  
impresión BioCell

*Caracterização Mecânica e Biológica de  
Scaffolds Produzidos por BioCell Printing*

Marco Domingos

2012



Universitat de Girona

TESIS DOCTORAL

Programa oficial de posgrado en Tecnologia

Doctorado en Caracterización de procesos de fabricación

Caracterización Mecánica y Biológica de  
Scaffolds producidos con tecnología de  
impresión BioCell  
*Caracterização Mecânica e Biológica de  
Scaffolds Produzidos por BioCell Printing*

por Marco Domingos

Dirigida por: Dr. Paulo Bártolo

Dr. Joaquim de Ciruana

2012

Memoria presentada para obtener el título de  
Doctor por la Universitat de Girona

Aos meus pais, Maria e Adriano Domingos,  
e à minha irmã Ana Domingos,  
por todo o apoio e carinho sempre demonstrados.



# Resumo

---

A metodologia mais utilizada ao nível da Engenharia de Tecidos envolve o uso de estruturas porosas tridimensionais (*scaffolds*), biocompatíveis e biodegradáveis, em conjugação com células de forma a promover a regeneração de tecidos. Este processo envolve no mínimo 3 etapas distintas, nomeadamente a produção das estruturas 3D, esterilização e deposição celular nos *scaffolds* e finalmente cultura celular do conjunto *scaffolds*-células. Para além do facto de parte destas etapas serem efectuadas manualmente, o processo não é igualmente contínuo nem integrado, conduzindo a baixas eficiências de deposição celular, elevado risco de contaminação das estruturas, elevados tempos de produção e reduzidas possibilidades de aplicação clínica directa dos produtos. De forma a contornar estas problemáticas, propõem-se neste trabalho de investigação o desenvolvimento de um novo sistema automático e integrado de produção e cultura celular *in vitro* de *scaffolds* denominado BioCell Printing. Este sistema compreende 4 zonas distintas de operação, nomeadamente construção por extrusão multimaterial (Zona 1), esterilização (Zona 2), deposição de células (Zona 3) e cultura celular em bioreactor (Zona 4), permitindo de modo sequencial, a produção de *scaffolds*/matrizes com gradientes funcionais com ou sem encapsulamento de células. Para além da concepção deste sistema, constitui elemento central do trabalho desenvolvido a validação do sistema de fabricação. Para tal foram produzidos *scaffolds* 3D em PCL com diferentes dimensões e geometrias de poros. As análises realizadas às estruturas permitiram verificar, que apesar dos parâmetros de processamento utilizados não induzirem mudanças significativas nas propriedades químicas e físicas iniciais do polímero, a variação da topologia interna dos *scaffolds* tem uma influência determinante no comportamento mecânico e biológico das estruturas produzidas. Com base nestes resultados, foram produzidos *scaffolds* bioactivos, nano e micro compósitos, de Policaprolactona (PCL) e Hidroxiapatita (HA) para regeneração óssea. Os resultados dos testes efectuados permitiram-nos observar o efeito da granulometria no comportamento mecânico dos *scaffolds* bem como no processo de adesão, proliferação e diferenciação de células estaminais mesenquimais humanas. A adesão e proliferação celular foram avaliadas através da definição de um factor geométrico que permite descrever a variação da morfologia celular com o tempo. A expressão osteogénica, fortemente dependente do material, foi avaliada através do método ALP.

**Palavras Chave:** Biofabricação, Células estaminais, Engenharia de Tecidos, *Scaffolds*.

# Resumen

---

El método comúnmente utilizado en el ámbito de la Ingeniería de Tejidos implica el uso de estructuras porosas tridimensionales (*scaffold*/andamio), biocompatibles y biodegradables, en conjugación con las células para promover la regeneración del tejido. Este proceso implica al menos tres etapas distintas, a saber: la producción de estructuras en 3D, la esterilización y deposición de las células en andamios (*scaffolds*) y, finalmente, el cultivo celular del conjunto andamios-células (*scaffolds*-células). Además de que estas etapas se realizan manualmente, el proceso no es continuo ni integrado, conduciendo a la baja eficiencia de la deposición celular, al elevado riesgo de contaminación de las estructuras, a elevados tiempos de producción y a limitadas posibilidades de aplicación clínica directa de los productos. Con el fin de evitar estos problemas, se propone en esta investigación el desarrollo de un nuevo sistema automatizado e integrado de producción y cultivo celular *in vitro* de andamios (*scaffolds*), denominado Biocell Printing. Este sistema integra 4 zonas distintas de operación, a saber: la construcción por extrusión multimaterial (Zona 1), la esterilización (Zona 2), la deposición de células (Zona 3) y el cultivo de células en biorreactor (Zona 4), para permitir de forma secuencial la producción de *scaffolds*/matrices con gradientes funcionales, con o sin encapsulación de células. Además del diseño de este sistema, constituye un objetivo central de este trabajo validar el sistema de fabricación. Así, fueron producidos andamios (*scaffolds*) 3D en PCL con diferentes dimensiones y geometrías de poros. El análisis realizado a las estructuras nos permitió comprobar que, aunque los parámetros de procesamiento utilizados no induzcan cambios significativos en las propiedades químicas y físicas iniciales del polímero, lo cierto es que la variación de la topología interna de los andamios (*scaffolds*) tiene una influencia decisiva en el comportamiento mecánico y biológico de las estructuras producidas. Con base en estos resultados, fueron producidos andamios (*scaffolds*) bioactivos, nano y micro compuestos de policaprolactona (PCL) y hidroxiapatita (HA) para la regeneración ósea. Los resultados de las pruebas realizadas nos han permitido observar el efecto de la granulometría en el comportamiento mecánico del andamio (*scaffold*), así como en el proceso de

adhesión, proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales humanas. La adhesión y la proliferación celular fueron evaluadas a través de la definición de un factor geométrico para describir el cambio en la morfología celular con el tiempo. El término osteogénico, dependiente en gran medida del material, fue evaluado a través del método ALP.

**Palabras clave:** Bioproducción, Células madre, Ingeniería de Tejidos, Andamios (*Scaffolds*).

## Abstract

---

The most common approach in Tissue Engineering involves the seeding of porous, biocompatible/biodegradable three-dimensional structures, with donor cells to promote tissue regeneration. This process comprises, at least, three different stages, namely the production of the 3D structures, sterilisation and cell seeding, and finally the culture of cell-scaffold constructs. Part of the stages are performed manually and the entire process is not continuous nor integrated, leading to low cell seeding efficiencies, high risk of contamination, long production times and reduced probability of direct clinical application of the products. This research work proposes a novel automated and integrated system for the production and *in vitro* culture of scaffolds, thus overcoming the abovementioned drawbacks. This system comprises 4 different operation zones, namely the construction via multi-material extrusion (Zone 1), sterilisation (Zone 2), cell seeding (Zone 3) and cell culture in a bioreactor (Zone 4), enabling, in a sequential manner, the production of functional graded scaffolds/matrices with or without encapsulated cells. The main goal of the present research work, besides the development of the device, was indeed the validation of the system. To assess the system, 3D PCL scaffolds with different pore sizes and geometries were produced and analyzed. The results revealed that process parameters do not induce significant chemical and physical changes on the polymeric material. On the other hand, the variation of scaffold's internal topology has a strong impact in terms of the mechanical and biological behavior of produced constructs. Based on these results, bioactive composite scaffolds were prepared using PCL in combination with nano and micro particles of Hydroxiapatite for bone regeneration. The obtained results highlight the effect of particle size both on the mechanical properties of the scaffolds as well on the adhesion, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. Cell adhesion and proliferation were evaluated through the definition of a geometrical factor which enables to describe cell morphology variation as a function of time. Osteogenic expression, strongly dependent on the material, was assessed with ALP method.

**Keywords:** Biofabrication, Stem cells, Tissue Engineering, Scaffolds.

# Agradecimentos

---

Após dois anos de trabalho dedicados quase por exclusivo à realização deste trabalho de investigação, privando muitas vezes a minha família e amigos do meu tempo e atenção, chegou por fim o momento de olhar para trás e fazer um balanço do que perdi e ganhei ao longo deste percurso. Os obstáculos foram sem dúvida muitos, desde as noites em claro causadas pelas incertezas de quem trilha um novo caminho à angústia e ao vazio provocados pela ausência dos que mais amamos. No entanto, nada ofusca a alegria que sinto hoje ao recordar todas as amizades que conquistei por esse mundo fora e que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a perceber que a vida tem mais sabor quando aprendemos a saborear as pequenas coisas que partilhamos!

Gostaria de começar por expressar a minha mais sincera gratidão ao Professor Paulo Bártolo, meu orientador científico. As palavras serão sempre escassas para lhe agradecer o apoio, a colaboração, a dedicação, a orientação científica, crítica minuciosa e exigência prestadas ao longo da realização desta dissertação. Mais do que um supervisor, tive o privilégio de privar com um amigo, alguém capaz de nos inspirar todos os dias através do seu carisma, da sua visão, do seu conhecimento científico e da sua imensa capacidade de trabalho. Foi a confiança que depositou em mim, mesmo nos momentos em que tudo parecia impossível, que me possibilitaram levar a cabo este trabalho. *“Há grandes homens que fazem com que todos se sintam pequenos. Mas o verdadeiro grande homem é aquele que faz com que todos se sintam grandes.”* A frase não é minha, mas é sem dúvida a que melhor encontro para descrever o Professor Paulo Bártolo, o Director e líder de um centro de investigação (CDRSP) constituído por um grupo de grandes homens.

Ao Professor Quim de Ciruana pela oportunidade que me deu de realizar este trabalho de Doutoramento na Universidade de Girona sob a sua co-supervisão. A forma como me acolheu, a sua constante motivação, disponibilidade, espírito crítico e conhecimento científico foram factores determinantes para a realização da presente dissertação.

Aos amigos Nuno Alves e Artur Mateus pelo seu constante apoio e motivação, mesmo nos momentos mais difíceis. Foram as palavras de incentivo, a boa disposição constante e os vossos sábios conselhos que nunca me deixaram desistir! Espero que saibam o quanto são realmente importantes para mim! Obrigado!

À Doutora Helena Bártolo pelo carinho e pelas palavras de conforto que sempre me dispensou ao longo destes últimos dois anos.

Uma palavra de gratidão também para o grupo de investigadores do *Institute for Composite and Biomedical Materials da University of Naples*, Itália, em especial para o Professor Luigi Ambrosio e Doutor Antonio Gloria, por toda a disponibilidade e apoio que me deram na realização de parte do trabalho presente nesta dissertação. A vossa amizade e contínuo suporte científico foram sem dúvida determinantes para a conclusão deste trabalho.

Ao Professor Geoffrey Mitchell e ao Professor Fred Davies da *University of Reading*, Reino Unido, pela preciosa contribuição que deram na caracterização química e morfológica dos materiais utilizados nesta dissertação.

Ao Doutor Nelson Ferreira pelo apoio prestado no desenvolvimento do software de controlo do sistema BioCell Printing. As suas ideias e as longas discussões tivemos constituíram um contributo muito relevante para esta dissertação.

Gostaria também de agradecer a todos os colegas do CDRSP que de uma forma ou de outra contribuíram para este trabalho. Uma palavra especial para o Luís Oliveira, Cyril dos Santos, Ruben Pereira, Tatiana Fernandes e Juliana Dias pela amizade e apoio constantes.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro concedido através do projecto *Micro-Stereo-Thermo-Lithography* (PTDC/EME-PME/098037/2008).

À Doutora Francesca Intranuovo que me acompanhou ao longo de todo este caminho e me apoiou de forma incondicional em todos os momentos. Foi ela que nunca me deixou baixar os braços, foi o seu sorriso que me fez acreditar e foi nela que encontrei a substância de todos os meus dias. Todas as palavras são pequenas perto do que ela representa para mim! Grazie!

Por fim, quero dedicar este trabalho à minha família! A minha vida só faz sentido convosco!



# Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.1:</b> Representação esquemática do osso cortical e esponjoso .....	2
<b>Figura 1.2:</b> Enxerto alogénico da parte superior direita do fémur .....	5
<b>Figura 1.3:</b> Próteses metálicas à base de titânio. a) joelho TKA Genus; b) anca APTA Stem.....	5
<b>Figura 1.4:</b> Implante cerâmico DUOWEDGE. ....	6
<b>Figura 1.5:</b> Estrutura da tese.....	12
<b>Figura 2.1:</b> Etapas relevantes da metodologia baseada no uso de <i>scaffolds</i> para ET. 1) Isolamento e expansão de células do paciente em cultura; 2) Deposição celular em <i>scaffolds</i> 3D; 3) Cultura dinâmica (bioreactor) do sistema <i>scaffold</i> +células; 4) Implante do sistema no paciente.....	29
<b>Figura 2.2:</b> Interpretação esquemática da adesão e proliferação celular em <i>scaffolds</i> de PCL/TCP (a), seguida da formação de neo-tecido. As imagens SEM permitem observar claramente que os osteoblastos em combinação com a matriz mineral migram para o interior do <i>scaffold</i> antes de cobrirem a totalidade dos poros .....	31
<b>Figura 2.3:</b> Células estaminais: diferenciação de hMSC em diferentes linhas celulares e tecidos humanos.....	42
<b>Figura 2.4:</b> Modulação celular através de factores extrínsecos. ....	43
<b>Figura 2.5:</b> Revisão cronológica das técnicas de AM e das suas aplicações em ET. Introdução de novas tecnologias e principais avanços científicos .....	45
<b>Figura 2.6:</b> Representação esquemática dos passos necessários para produção de <i>scaffolds</i> para ET através do uso de técnicas de AM .....	46
<b>Figura 2.7:</b> Modelos CAD 3D e modelos físicos de implantes personalizados produzidos por extrusão. a) modelo CAD de implante mamário; b) modelo CAD do úmero humano; c) modelo CAD de uma orelha; d) modelo físico implante mamário; e) modelo físico do úmero humano; f) modelo físico de uma orelha.....	47
<b>Figura 2.8:</b> Exemplos de estruturas com células encapsuladas. a) hidrogéis à base de polietilenoglicol dimetacrilato com células encapsuladas preparado por SLA. b) estrutura de gelatina/alginato/fibrinogénio contendo células estaminais adiposas (rosa) e hepatócitos encapsulados em estruturas de gelatina/alginato/quitosano (branco) produzidos por bioimpressão.....	48
<b>Figura 2.9:</b> Metodologia para fabricação indirecta de <i>scaffolds</i> .....	49
<b>Figura 2.10:</b> Representação esquemática do processo de estereolitografia.....	50

<b>Figura 2.11:</b> Representação esquemática do sistema STLG. ....	52
<b>Figura 2.12:</b> Representação esquemática do processo de STLG: sistema multi-material. ....	53
<b>Figura 2.13:</b> Sistema de micro-estereolitografia integrante desenvolvido no CDRSP. ....	54
<b>Figura 2.14:</b> Sistema <i>Digital Mirror Device</i> (DMD). ....	54
<b>Figura 2.15:</b> Matriz polimérica à base de pHEMA produzida através do sistema de estereolitografia integrante desenvolvido no CDRSP. ....	55
<b>Figura 2.16:</b> Representação esquemática do processo de estereolitografia modificado, no qual a solução contendo polímero e células é depositado manualmente na tina, camada a camada, de baixo para cima. ....	56
<b>Figura 2.17:</b> Processo para a formação de microestruturas de hidrogel contendo células. ....	57
<b>Figura 2.18:</b> Representação esquemática do processo SLS. ....	58
<b>Figura 2.19:</b> Imagens SEM de material compósito à base de PEEK-10% wt HA (a) antes e (b) depois da sinterização. c) Vista inferior de <i>scaffold</i> compósito de PEEK-HA. ....	59
<b>Figura 2.20:</b> a) Imagens SEM de microesferas nano-compósitas à base de PLLA/CHAp. b) <i>Scaffolds</i> nano-compósitos de PLLA/CHAp. ....	60
<b>Figure 2.21:</b> Janela de processamento de compósitos de HA/HDPE através de SLS. ....	61
<b>Figure 2.22:</b> Imagens SEM da superfície das camadas sinterizadas utilizando uma velocidade de varrimento constante de 1200 mm/s e diferentes potências de laser: a) 3.6W; b) 7.2W. ....	61
<b>Figura 2.23:</b> Prótese femoral em titânio produzido através de EBM. ....	62
<b>Figura 2.24:</b> Moldura dentária em titânio produzida por SLS. ....	63
<b>Figure 2.25:</b> Representação esquemática do processo LENS. ....	63
<b>Figura 2.26:</b> Representação esquemática do processo EBM. ....	64
<b>Figura 2.27:</b> Representação esquemática do processo de FDM. ....	65
<b>Figura 2.28:</b> Imagens de SEM (a e b), coloração com safranina-O (c) e teste <i>live/dead</i> obtidas a partir de <i>scaffolds</i> em PEGT/PBT cultivados <i>in vitro</i> com condrócitos. ....	66
<b>Figura 2.29:</b> Sistema PED desenvolvido pela Universidade de Drexel (EUA). ....	67
<b>Figura 2.30:</b> Sistema <i>Multi-Nozzle Deposition</i> desenvolvido pela Universidade de Drexel (EUA). ....	68
<b>Figura 2.31:</b> a) Representação esquemática do sistema LDM. b) Exemplo de <i>scaffolds</i> compósitos de PLLA/TCP produzidos por LDM. ....	69
<b>Figura 2.32:</b> Sistema <i>Pressure Assisted Microsyringe</i> . ....	70
<b>Figura 2.33:</b> Estruturas 2D em PCL/PLLA obtidas através do sistema PAM. ....	70
<b>Figura 2.34:</b> Ilustração do processo <i>Robocasting</i> . ....	71
<b>Figura 2.35:</b> Sistema <i>Robotic Dispensing</i> . ....	72
<b>Figura 2.36:</b> Sistema <i>BioExtruder</i> . ....	72

<b>Figura 2.37:</b> a) Sistema de extrusão mono-material; c) Sistema de extrusão multimaterial. ....	73
<b>Figura 2.38:</b> Representação esquemática do processo de impressão 3D. ....	74
<b>Figura 2.39:</b> Representação esquemática do processo BioLP .....	76
<b>Figura 2.40:</b> Representação esquemática de bioreactores para ET. a) <i>Spinner flask</i> ; b) Rotativo; c) <i>Hollow-fiber</i> ; d) Perfusão .....	77
<b>Figura 3.1:</b> Estrutura química do Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona).....	105
<b>Figura 3.2:</b> Representação esquemática do mecanismo de degradação hidrolítica do PCL. ...	106
<b>Figura 3.3:</b> Representação esquemática do processo de fragmentação cristalina e degradação das zonas amorfas.....	107
<b>Figura 3.4:</b> Curva típica obtida a partir de uma análise DSC de um polímero. ....	111
<b>Figura 3.5:</b> Representação esquemática de DSC de compensação de energia .....	112
<b>Figura 3.6:</b> Representação esquemática de DSC por fluxo de calor .....	112
<b>Figura 3.7:</b> Termograma ilustrativo das curvas de TG (vermelho) e respectiva derivada (azul). ... .....	113
<b>Figura 3.8:</b> Representação esquemática de um sistema de TGA.....	114
<b>Figura 3.9:</b> Secção transversal da estrutura porosa (fase estacionária). Mecanismo de separação por SEC.....	115
<b>Figura 3.10:</b> Representação esquemática de um sistema de GPC.....	116
<b>Figura 3.11:</b> Representação esquemática de um SEM. ....	117
<b>Figura 3.12:</b> Representação esquemática dos principais componentes de um sistema de $\mu$ CT .....	118
<b>Figura 4.1:</b> Sistema BioCell Printing. a) modelo CAD 3D; b) unidade protótipo. ....	128
<b>Figura 4.2:</b> Representação esquemática das 4 zonas da BioCell Printing. a) Construção de <i>scaffolds</i> (Zona 1); b) Esterilização (Zona 2); c) Deposição celular (Zona 3); d) Cultura celular (Zona 4) .....	129
<b>Figura 4.3:</b> Sistema de esterilização por lâmpadas U.V. ....	130
<b>Figura 4.4:</b> Representação do acoplamento do bioreactor multifuncional ao sistema BioCell Printing. ....	131
<b>Figura 4.5:</b> Representação esquemática do bioreactor multifuncional. As zonas A e B indicadas na figura correspondem à zona de armazenamento de cultura celular, respectivamente.....	132
<b>Figura 4.6:</b> Interface da plataforma com ilustração dos seis domínios de comunicação e gestão da informação do sistema BioCell Printing. ....	133
<b>Figura 4.7:</b> Ilustração esquemática do processo de produção de <i>scaffolds</i> utilizando a plataforma de gestão de informação associada à BioCell Printing.....	134
<b>Figura 4.8:</b> Janela principal do software de <i>Computer Aided design of Scaffolds</i> (CADS) .....	135

<b>Figura 4.9:</b> Ilustração do carro e sistema de suporte das extrusoras. ....	138
<b>Figura 4.10:</b> Sistema de extrusão multi-material composto por duas cabeças de extrusão. a) modelo CAD 3D; b) modelo físico. ....	139
<b>Figura 4.11:</b> Representação esquemática da secção transversal do fuso do sistema de extrusão. Todas as medidas estão reportadas em milímetros. ....	139
<b>Figura 4.12:</b> Ilustração detalhada do sistema de extrusão. ....	140
<b>Figura 4.13:</b> Controlador de temperatura de 3 zonas (a) e fonte de alimentação (b). ....	141
<b>Figura 4.14:</b> Plataforma móvel de construção. a) modelo CAD; b) modelo real. ....	142
<b>Figura 4.15:</b> Esquema de funcionamento do controlador MAXNC. ....	142
<b>Figura 4.16:</b> Interface do software de controlo CAMOS. ....	143
<b>Figura 4.17:</b> Diferentes estratégias de varrimento. a) contorno; b) varrimento; c) contorno e varrimento. ....	144
<b>Figura 4.18:</b> <i>Software</i> de programação do controlador – Mach3. ....	146
<b>Figura 4.19:</b> Modelo CAD 3D do <i>scaffold</i> utilizado na validação do sistema BioCell Printing. A, L e C representam as dimensões teóricas do scaffolds (A-altura, L-largura e C-comprimento). ....	147
<b>Figura 4.20:</b> <i>Scaffold</i> em PCL com dimensões de 30 mm x 30 mm x 8mm. ....	148
<b>Figura 4.21:</b> Imagem SEM de <i>scaffold</i> em PCL (vista de topo). Detalhe ilustrativo da adesão entre filamentos de camadas adjacentes (canto superior esquerdo). ....	149
<b>Figura 4.22:</b> Estruturas em PCL produzidas com a BioCell Printing. a) Cilindro oco; b) disco semi-circular. ....	150
<b>Figura 5.1:</b> Representação esquemática de <i>scaffolds</i> com ângulo de deposição de 0/90°. a) Vista da secção transversal com indicação dos parâmetros geométricos, nomeadamente diâmetro do filamento (RW), distância entre centros de filamentos (FD), espaçamento entre filamentos (FG), espaçamento entre camadas (LG) e <i>slice thickness</i> (ST). b) Modelo CAD 3D. ....	156
<b>Figura 5.2:</b> Representação esquemática dos <i>scaffolds</i> produzidos com diferentes ângulos de deposição. a) 0/90°. b) 0/60/120°. c) 0/45/90/135°. ....	156
<b>Figura 5.3:</b> Imagens SEM de <i>scaffolds</i> em PCL com diferentes valores de FD. a) vista de topo FD = 750 µm; b) vista secção transversal FD = 750 µm; c) vista de topo FD = 650 µm; d) vista secção transversal FD = 650 µm; e) vista de topo FD = 550 µm; f) vista secção transversal FD = 650 µm. ....	163
<b>Figura 5.3 (continuação):</b> Imagens SEM de <i>scaffolds</i> em PCL com diferentes valores de FD. e) vista de topo FD = 550 µm; f) vista secção transversal FD = 650 µm. ....	164

<b>Figura 5.4:</b> Imagens SEM de <i>scaffolds</i> em PCL com diferentes ângulos de deposição. a) vista de topo com ângulo de 0/90°; b) vista secção transversal com ângulo de 0/90°; c) vista de topo com ângulo de 0/60/120°; d) vista secção transversal com ângulo de 0/60/120°. .....	165
<b>Figura 5.4</b> (continuação): Imagens SEM de <i>scaffolds</i> em PCL com diferentes ângulos de deposição. e) vista de topo com ângulo de 0/45/90/135°; f) vista secção transversal com ângulo de 0/45/90/135°. .....	166
<b>Figura 5.5:</b> Efeito da variação da distância entre filamentos (FD) no comportamento mecânico dos <i>scaffolds</i> 3D. Curvas de tensão/extensão obtidas a partir da compressão de <i>scaffolds</i> produzidos com ângulo de deposição constante (0/90°) e FD variável (750 µm, 650 µm e 550 µm). .....	169
<b>Figura 5.6:</b> Efeito da variação dos ângulos de deposição no comportamento mecânico dos <i>scaffolds</i> 3D. Curvas de tensão/extensão obtidas a partir da compressão de <i>scaffolds</i> produzidos com FD constante (650 µm) e ângulo de deposição variável (0/90°, 0/60/120°, 0/45/90/135°). .....	170
<b>Figura 5.7:</b> Percentagem de redução de Alamar Blue™ em função da dimensão de poro utilizando células hMSC. ....	174
<b>Figura 5.8:</b> Percentagem de redução de Alamar Blue™ em função da geometria de poro utilizando células hMSC. ....	175
<b>Figura 5.9:</b> Actividade da ALP relativa às células hMSC depositadas em <i>scaffolds</i> com diferentes dimensões de poros e cultivadas ao longo de 21 dias. Os dados encontram-se reportados na forma de valor médio ± desvio padrão e normalizados por ng de DNA. ....	177
<b>Figura 5.10:</b> Actividade da ALP relativa às células hMSC depositadas em <i>scaffolds</i> com diferentes geometrias de poro e cultivadas ao longo de 21 dias. Os dados encontram-se reportados na forma de valor médio ± desvio padrão e normalizados por ng de DNA. ....	179
<b>Figura 5.11:</b> Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de estruturas <i>scaffold</i> /células. Nas imagens são evidenciados os filamentos de actina das células (colorados a vermelho por faloidina) que aderiram e proliferaram ao longo dos filamentos dos <i>scaffolds</i> de PCL. A barra de escala tem a dimensão de 100 µm. a) dia 7; b) dia 14; c) dia 21. ....	180
<b>Figura 5.12:</b> Factor geométrico celular calculado a partir de células depositadas em <i>scaffolds</i> com FD de 750 µm e ângulo de deposição de 0/90°. ....	181
<b>Figura 6.1:</b> <i>Scaffold</i> 3D submetido à compressão utilizando uma INSTRON 5566 equipada com uma célula de carga de 10 kN. ....	195
<b>Figura 6.2:</b> Imagens SEM de <i>scaffolds</i> em PCL, PCL_HA_S e PCL_HA_F. a) vista de topo PCL; b) vista secção transversal PCL; c) vista de topo PCL_HA_S; d) vista secção transversal PCL_HA_S; e) vista de topo PCL_HA_F; f) vista secção transversal PCL_HA_F. ....	197

<b>Figura 6.3:</b> Vista de topo do filamento de PCL_HA_S obtida por SEM. Canto superior direito: ampliação 5000x. ....	199
<b>Figura 6.4:</b> Vista de topo do filamento de PCL_HA_F obtida por SEM. Canto superior direito: ampliação 5000x. ....	199
<b>Figura 6.5:</b> Vista secção transversal do filamento de PCL_HA_S obtida por SEM. Canto superior direito: ampliação 10000x.....	200
<b>Figura 6.6:</b> Vista secção transversal do filamento de PCL_HA_F obtida por SEM. Canto superior direito: ampliação 10000x.....	200
<b>Figura 6.7:</b> Análise qualitativa dos picos referentes aos elementos Carbono (C) e Oxigénio (O) característicos do PCL presente na superfície dos <i>scaffolds</i> de PCL.....	201
<b>Figura 6.8:</b> Análise qualitativa dos picos referentes aos elementos Fósforo (P) e Cálcio (Ca) característicos da HA presente na superfície dos <i>scaffolds</i> de PCL_HA_S.....	202
<b>Figura 6.9:</b> Análise qualitativa dos picos referentes aos elementos Fósforo (P) e Cálcio (Ca) característicos da HA presente na superfície dos <i>scaffolds</i> de PCL_HA_F.....	202
<b>Figura 6.10:</b> Reconstrução 3D obtida a partir microtomografias de <i>scaffolds</i> de PCL e PCL/HA. a) Vista lateral <i>scaffold</i> PCL; b) Vista lateral <i>scaffold</i> PCL_HA_S; c) Vista lateral <i>scaffold</i> PCL_HA_F; d) Vista de topo <i>scaffold</i> PCL; e) Vista de topo <i>scaffold</i> PCL_HA_S; Vista de topo <i>scaffold</i> PCL_HA_F.....	203
<b>Figura 6.11:</b> Curvas termogravimétricas correspondentes ao PCL não processado (PCL_Granular), PCL processado/ <i>scaffold</i> (PCL), <i>scaffold</i> nano compósito (PCL_HA_S) e <i>scaffold</i> micro compósito (PCL_HA_F).....	204
<b>Figura 6.12:</b> Efeito da adição e variação da granulometria das partículas de HA no comportamento mecânico dos <i>scaffolds</i> 3D. Curvas de tensão/extensão obtidas a partir da compressão de <i>scaffolds</i> produzidos com ângulo de deposição e FD constantes de 0/90° e 750 µm, respectivamente. ....	206
<b>Figura 6.13:</b> Percentagem de redução de Alamar Blue™ em função da presença e granulometria de HA.....	209
<b>Figura 6.14:</b> Actividade da ALP relativa às células hMSC depositadas em <i>scaffolds</i> de PCL, PCL_HA_S e PCL_HA_F e cultivadas ao longo de 21 dias. Os dados encontram-se reportados na forma de valor médio ± desvio padrão e normalizados por ng de DNA.....	210
<b>Figura 6.15:</b> Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de estruturas <i>scaffold</i> /células. Nas imagens são evidenciados os filamentos de actina das células (colorados a vermelho por faloidina) que aderiram e proliferaram ao longo dos filamentos dos <i>scaffolds</i> de PCL, PCL_HA_S e PCL_HA_F. A barra de escala tem a dimensão de 100 µm.....	212

**Figura 6.16:** Factor geométrico celular calculado a partir de células depositadas em *scaffolds* de PCL, PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F com FD de 750  $\mu\text{m}$  e ângulo de deposição de 0/90°. ..... 213

**Figura 7.1:** Representação esquemática do princípio de fabricação aditiva de tecidos. a) MRI de um peito; b) Produção simultânea de *scaffold* (material termoplástico biodegradável) e deposição de células encapsuladas em hidrogéis: pré-adipócitos em ME artificial (gel biomimético) e células musculares em ME artificial (gel biomimético); c) sistema neo-tecido 3D produzido; d) Implante..... 225

# Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 2.1:</b> Biomateriais para produção de <i>scaffolds</i> /matrizes para regeneração óssea..	39
<b>Tabela 2.1 (cont.):</b> Biomateriais para produção de <i>scaffolds</i> /matrizes para regeneração óssea. ....	40
<b>Tabela 2.2:</b> Tipos de células ósseas e respectivas funções. ....	43
<b>Tabela 2.3:</b> Vantagens e desvantagens das técnicas comerciais de AM. ....	79
<b>Tabela 4.1:</b> Parâmetros de processo, sistema e design. ....	138
<b>Tabela 4.2:</b> Condições de processamento utilizadas na produção de <i>scaffolds</i> em PCL....	147
<b>Tabela 5.1:</b> Parâmetros de processo e sistema utilizados para a extrusão dos <i>scaffolds</i> através da BioCell Printing. Os parâmetros representados referem-se à velocidade de deposição (DV, do inglês <i>Deposition Velocity</i> ), <i>slice thickness</i> (ST), temperatura de fusão (LT, do inglês <i>Liquefier Temperature</i> ), pressão de extrusão (EP, do inglês <i>Extrusion Pressure</i> ) e velocidade de rotação do fuso (SRV, do inglês <i>Screw Rotation Velocity</i> ). ....	157
<b>Tabela 5.2:</b> Valores teóricos pré-definidos para a construção dos <i>scaffolds</i> . ....	158
<b>Tabela 5.3:</b> Características morfológicas dos <i>scaffolds</i> extrudidos com ângulo de deposição 0/90° e diferentes valores de FD. ....	164
<b>Tabela 5.4:</b> Características morfológicas dos <i>scaffolds</i> extrudidos com FD constante de 650 µm e ângulo de deposição variável. ....	166
<b>Tabela 5.5:</b> Propriedades térmicas relativas ao material (PCL) processado e não-processado. Os símbolos $T_F$ , $\Delta H_F$ e $X_C$ correspondem à temperatura de fusão, entalpia de fusão e grau de cristalinidade, respectivamente. ....	167
<b>Tabela 5.6:</b> Distribuição dos pesos moleculares das amostras processadas e não processadas. ....	168
<b>Tabela 5.7:</b> Efeito da variação do FD nas propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> . Ângulo de deposição constante (0/90°) e FD variável (750 µm, 650 µm e 550 µm). ....	171



<b>Tabela 5.8:</b> Efeito da variação do ângulo de deposição nas propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> . FD constante (650 $\mu\text{m}$ ) e ângulo de deposição variável (0/90°, 0/60/120°, 0/45/90/135°). .....	171
<b>Tabela 6.1:</b> Parâmetros de processo e sistema utilizados para a extrusão de <i>scaffolds</i> compósitos de PCL/HA. Os parâmetros representados referem-se à velocidade de deposição (DV), <i>slice thickness</i> (ST), temperatura de fusão (LT), pressão de extrusão (EP) e velocidade de rotação do fuso (SRV). .....	192
<b>Tabela 6.2:</b> Valores teóricos pré-definidos para a construção de <i>scaffolds</i> em PCL e PCL/HA. ....	193
<b>Tabela 6.3:</b> Características morfológicas dos <i>scaffolds</i> compósitos extrudidos com ângulo de deposição 0/90° e FD de 750 $\mu\text{m}$ . .....	198
<b>Tabela 6.4:</b> Valores experimentais de porosidade e interconectividade relativos aos <i>scaffolds</i> de PCL e PCL/HA. ....	203
<b>Tabela 6.5:</b> Efeito da adição e granulometria de HA nas propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> compósitos à base de PCL. ....	207

## Lista de Siglas

---

- μCT** - Microtomografia computadorizada (do inglês *Micro-Computed Tomography*)
- 2D** - Bidimensional
- 3D** - Tridimensional
- 3DP** - Impressão 3D (do inglês *Three Dimensional Printing*)
- ALP** - Fosfatase Alcalina (do inglês *Alkaline Phosphatase*),
- AM** - Fabricação aditiva (do inglês *Additive Manufacturing*)
- ASTM** - *American Society for Testing and Materials*
- BioLP** - *Biological Laser Printing*
- BIOMAS** - *Biomanufacturing and Engineering of Scaffolds*
- BMP's** - Proteínas morfogénicas ósseas (do inglês *Bone Morphogenetic Proteins*)
- CAD** - Desenho Assistido por Computador (do inglês *Computer Aided Design*)
- CADS** - *Computer Aided Design of Scaffolds*
- CAE** - Engenharia Assistida por Computador (do inglês *Computer Aided Engineering*)
- CAM** - Fabricação assistida por computador (do inglês *Computer Aided Manufacturing*)
- CAMOS** - *Computer Aided Manufacturing of Scaffolds*
- CHAp** - Hidroxiapatita carbonatada
- CHCl<sub>3</sub>** - Clorofórmio
- CNC** - Controlo numérico computadorizado (do inglês *Computer Numerical Control*)
- CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono
- COOH** - Grupo carboxílico
- DC** - Corrente directa (do inglês *Direct Current*)
- DMD** - *Digital Micro-Mirror Device*
- DSC** - Calorimetria diferencial de varrimento (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*)
- DV** - Velocidade de deposição (do inglês *Deposition Velocity*)
- EBM** - *Electron Beam Melting*
- EDS** - Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (do inglês *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*)
- EP** - Pressão de extrusão (do inglês *Extrusion Pressure*)

**ESB** - Sociedade Europeia de Biomateriais (do inglês *European Society for Biomaterials*)

**ET** - Engenharia de tecidos

**FD** - Distância entre centros de filamentos (do inglês *Filament Distance*)

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**FDC** - *Fused Deposition of Ceramics*

**FDM** - *Fused Deposition Modeling*

**FG** - Espaçamento entre filamentos (do inglês *Filament Gap*) ou dimensão de poro

**FGF** - Factores de crescimento de fibroblastos (do inglês *Fibroblast Growth Factor*)

**GAGs** - Glicosaminoglicanos

**GF** - Factor de crescimento (do inglês *Growth factor*)

**GPC** - Cromatografia de permeação em gel (do inglês *Gel Permeation Chromatography*)

**HA** - Hidroxiapatita

**HDPE** - Polietileno de alta densidade

**hMSC** - Células estaminais mesenquimais humanas (do inglês *human Mesenchymal Stem Cells*)

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

**HYAFF 11** - Polímero sintético derivado do ácido hialurónico

**IR** - Radiação infravermelha (do inglês *Infrared Radiation*)

**ISO** - *International Organization for Standardization*

**LDM** - *Low-temperature Deposition Manufacturing*

**LENS** - *Laser Engineering Net Shaping*

**LG** - Espaçamento entre camadas (do inglês *Layer Gap*)

**LT** - Temperatura de fusão (do inglês *Liquefier Temperature*)

**ME** - Matriz extracelular

**Mg** - Magnésio

**N<sub>2</sub>** - Azoto

**NGF** - Factores de crescimento nervoso (do inglês *Nerve Growth Factor*)

**NH<sub>2</sub>** - Grupo amina

**NH<sub>3</sub>** - Amónia

**O<sub>2</sub>** - Oxigénio

**OH** - Grupo hidroxilo

**PA** - Polianidridos

**PAM** - *Pressure Assisted Microsyringe*

**PBS** - Tampão fosfato-salino (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

**PBT** - poli(butileno tereftalato)

**PCL** - Policaprolactona

**PDGF** - Factores de crescimento derivados de plaquetas (do inglês *Platelet Derived Growth Factor*)

**PEEK** - poli-éter-éter cetona

**PEG** - Polietilenoglicol

**PEGT** - poli(etileno glicol)-tereftalato

**PF** - Polifosfazenos

**PGA** - Ácido poliglicólico

**PHAs** - Polihidroxicanoatos

**pHEMA** - poli (hidroxietilmetacrilato)

**PID** - *Proportional–Integral–Derivative controller*

**PLA** - Ácido poliláctico

**PLGA** - Ácido poli(láctico-co-glicólico)

**PLLA** - Ácido poli-L-láctico

**PPF** - Polipropileno Fumarato

**PS** - Poliestireno

**PUs** - Poliuretanos

**PVA** - Álcool polivinílico

**RP** - Prototipagem rápida (do inglês *Rapid Prototyping*)

**rSMC** - Células musculares lisas extraídas de ratos (do inglês *rat Smooth Muscle Cells*)

**RW** - Diâmetro de filamentos (do inglês *Road Width*)

**SEC** - Cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês *Size Exclusion Chromatography*)

**SEM** - Microscopia electrónica de varrimento (do inglês *Scanning Electron Microscopy*)

**SFF** - Solid Freeform

**SLA** - Estereolitografia

**SLI** - *Slice*

**SLS** - Sinterização selectiva por laser (do inglês *Selective Laser Sintering*)

**SRV** - Velocidade de rotação do fuso (do inglês *Screw Rotation Velocity*).

**ST** - *Slice Thickness*

**STL** - *Standard tessellation language*

**STLG** - Estereo-termo-litografia (do inglês *Stereo-Thermal-Lithography*)

**TCP** - Fosfato tricálcico (do inglês *Tricalcium Phosphate*)

**TGA** - Termogravimetria (do inglês *Thermogravimetric Analysis*)

**TGF** - Factores de crescimento transformadores (do inglês *Transforming Growth Factor*)

**U.V.** - Ultravioleta

**VEGF** - Factores de crescimento endotelial vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)

**β-TCP** - Beta fosfato tricálcico (do inglês *Beta Tricalcium Phosphate*)

# Índice

---

Resumo.....	i
Agradecimentos .....	vi
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xvi
Lista de Siglas.....	xiii
Índice.....	xxii

---

## Capítulo 1: Introdução

---

1.1 Introdução .....	1
1.2 Biologia do osso.....	2
1.3 Engenharia de tecidos.....	6
1.4 Objectivos e estrutura da tese.....	9

---

## Capítulo 2: Estado da arte

---

2.1 Regeneração de tecidos baseada no uso de <i>scaffolds</i> .....	17
2.2 Biomateriais para produção de <i>scaffolds</i> .....	28
2.3 Células.....	31
2.4 Tecnologias de produção de <i>scaffolds</i> .....	34

2.4.1 Tecnologias convencionais .....	34
2.4.2 Tecnologias não-convencionais .....	35
<b>2.5 Bioreactores.....</b>	<b>66</b>
<b>2.6 Sumário.....</b>	<b>68</b>

---

## **Capítulo 3: Materiais e técnicas de caracterização**

---

<b>3.1 Materiais.....</b>	<b>70</b>
3.1.1 Policaprolactona .....	70
3.1.2 Hidroxiapatita .....	74
<b>3.2 Técnicas de caracterização .....</b>	<b>76</b>
3.2.1 Calorimetria diferencial de varrimento .....	76
3.2.2 Termogravimetria .....	79
3.2.3 Cromatografia de exclusão por tamanho .....	80
3.2.4 Microscopia electrónica de varrimento.....	82
3.2.5 Microtomografia computadorizada 3D .....	84
<b>3.3 Sumário.....</b>	<b>85</b>

---

## **Capítulo 4: Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – sistema BioCell Printing**

---

<b>4.1 Introdução .....</b>	<b>86</b>
<b>4.2 Sistema BioCell Printing.....</b>	<b>88</b>
<b>4.3 Sistema de fabricação aditiva (Zona 1).....</b>	<b>97</b>

4.3.1 Hardware .....	97
4.3.2 Software.....	103
4.3.3 Validação.....	106
<b>4.4 Sumário.....</b>	<b>110</b>

---

## **Capítulo 5: Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de *scaffolds* em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing**

---

<b>5.1 Introdução .....</b>	<b>112</b>
<b>5.2 Materiais e métodos.....</b>	<b>113</b>
5.2.1 Design e produção de <i>scaffolds</i> .....	113
5.2.2 Caracterização de <i>scaffolds</i> .....	115
<b>5.3 Resultados e discussão .....</b>	<b>120</b>
<b>5.4 Sumário.....</b>	<b>140</b>

---

## **Capítulo 6: Desenvolvimento de *scaffolds* bioativos à base de Policaprolactona e Hidroxiapatita**

---

<b>6.1 Introdução .....</b>	<b>144</b>
<b>6.2 Materiais e métodos .....</b>	<b>146</b>
6.2.1 Preparação de misturas PCL/HA.....	146
6.2.2 Design e produção de <i>scaffolds</i> de PCL/HA.....	147
6.2.3 Caracterização de <i>scaffolds</i> .....	147
<b>6.3 Resultados e discussão .....</b>	<b>151</b>
<b>6.4 Sumário.....</b>	<b>169</b>



---

## **Capítulo 7: Conclusões e trabalhos futuros**

---

**7.1 Conclusões..... 170**

**7.2 Trabalhos futuros ..... 174**

---

## **Capítulo 8: Referências**

---

---

## **Anexos**

---

**A.1 Componentes do sistema BioCell Printing**

**A.2 Protocolos Alkaline Phosphatase Assay e Quant-iT™ PicoGreen**

# Capítulo 1 – Introdução

---

## 1.1- Introdução

O transplante de órgãos ou tecidos, tais como coração, fígado, rim, pele e osso, é actualmente uma das terapias com maior taxa de sucesso na resolução de problemas causados por doenças congénitas, traumas ou ferimentos. No entanto, o número de doadores disponíveis é claramente insuficiente face à crescente procura de órgãos e tecidos para transplante. Tal como reportado pela *United Network for Organ Sharing (UNOS, 2011)* existiam, só nos E.U.A, cerca de 113.022 pacientes à espera de um transplante [1]. No caso específico do tecido ósseo, o impacto clínico e económico dos tratamentos associados à regeneração óssea têm vindo a aumentar significativamente ao longo dos últimos anos. A título de exemplo, o número de artroplastias articulares totais conjuntamente com o número de cirurgias de revisão ortopédica registadas nos E.U.A aumentou de 700.000 em 1998 para cerca de 1.1 milhões em 2005 [2]. As despesas médicas relacionadas com fracturas, reimplantação e substituição de junções articulares do joelho e anca representaram cerca de 20 biliões de dólares em 2003, estimando-se uma subida deste valor para 74 biliões de dólares em 2015 [2-3]. Outro importante exemplo clínico diz respeito à artrodese ou fusão vertebral que requer uma substancial substituição/reparação de tecido ósseo. Só no ano de 2005 foram efectuadas mais de 300.000 intervenções deste género com um custo total de 20 biliões de dólares [2]. As fracturas ósseas causadas por traumas deram origem a mais de 8.5 milhões de consultas ortopédicas em 2005, das quais cerca de 1 milhão resultou em internamento [2]. Também em 2005, foram contabilizados mais de 3000 internamentos pediátricos devido a cancro ósseo com custos associados da ordem dos 70 milhões de dólares [2]. A escassez de órgãos, os efeitos colaterais provocados pelos agentes imunossupressores bem como os custos associados são factores limitadores a nível do sucesso e sustentabilidade futura destas terapias. Como tal, existe actualmente uma necessidade urgente de desenvolver novas metodologias e terapêuticas capazes de oferecer soluções eficazes, abrangentes e de baixo custo para o tratamento de defeitos ou lesões ósseas. Estas soluções terão necessariamente de

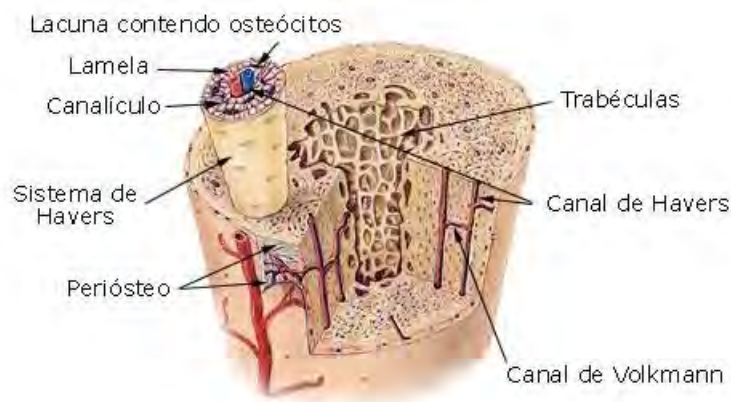
passar pelo aumento do conhecimento a nível da biologia óssea, materiais e tecnologias para produção de implantes.

## 1.2 – Biologia do osso

O osso é um tecido dinâmico, altamente vascularizado, com a capacidade única de se auto-regenerar e remodelar sem deixar cicatrizes [4]. Estas propriedades conjuntamente com a sua capacidade de rapidamente produzir e armazenar constituintes minerais de acordo com as necessidades metabólicas, tornam-no num dos mais avançados materiais naturais.

Para além da sua principal função que é fornecer suporte estrutural ao corpo serve também como reservatório mineral, promove a locomoção através do suporte da contração muscular, suporta os diversos esforços a que o organismo está sujeito e protege os órgãos internos [4-7]. O osso é uma estrutura leve e rígida, sem no entanto apresentar um comportamento frágil. Possui também uma alta resistência à tracção, resultado da combinação entre partes de osso denso e outras porosas reforçadas nos pontos de tensão [8].

No esqueleto de um adulto, o osso encontra-se organizado em duas formas arquitectónicas distintas: trabecular ou esponjoso (constitui cerca de 20% do total do esqueleto), e cortical ou compacto (cerca de 80% do total do esqueleto), sendo que as suas proporções podem variar de acordo com a sua localização no esqueleto (Figura 1.1).



**Figura 1.1:** Representação esquemática do osso cortical e esponjoso [2].

## Capítulo 1 - Introdução

O osso cortical é bastante denso (10% porosidade) podendo ser dividido em três classes de acordo com a sua forma nomeadamente, ossos longos (fémur e tibia), ossos curtos (pulso e tornozelo) e ossos planos (crânio e ossos irregulares) [6, 9]. Por sua vez o osso trabecular apresenta uma elevada porosidade (entre 50% a 90%) o que torna a sua resistência mecânica, nomeadamente o seu módulo elástico e resistência à compressão cerca de 20 vezes inferior comparativamente à do osso cortical. Apresenta uma estrutura do tipo esponjosa, com um conjunto de filamentos de diversos tamanhos designados de “*trabeculae*”. Pode ser encontrado na metáfise de ossos longos cobertos por osso cortical [6, 9-11].

O tecido ósseo é constituído por uma matriz mineral que suporta uma população heterogénea de células responsáveis pela produção de moduladores biológicos que controlam o metabolismo local do osso. A produção, manutenção e reabsorção deste tecido resulta da interacção entre três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Estas células têm tarefas bem definidas e são responsáveis pela manutenção de um osso saudável [12-17]. Os osteoblastos derivam de células precursoras existentes na medula óssea. Apresentam uma forma cubóide e encontram-se localizados na superfície do osso onde formam uma espessa camada de células. De acordo com determinados estímulos mecânicos tornam-se responsáveis pela síntese, regulação, deposição e mineralização da Matriz Extracelular (ME) [13]. Os osteócitos são caracterizados por apresentarem uma morfologia em forma de estrela mas com menos organelos comparativamente aos osteoblastos. Encontram-se localizados nas lacunas da ME e regulam a resposta do osso de acordo com o ambiente mecânico (células mecanosensoras), controlando a osteólise (lise ou destruição óssea) que permite a libertação de cálcio no processo de homeostasia. Os osteócitos podem também estar envolvidos na comunicação intercelular [15].

Os osteoclastos, são células polarizadas multinucleadas localizadas na superfície do osso. Resultam da fusão de monócitos e são responsáveis pela reabsorção de osso durante o processo de remodelação óssea. [12-20].

A constituição da ME é responsável pelas excelentes propriedades mecânicas apresentadas pelo osso, sendo composta por uma parte mineral à base de hidroxiapatita (HA), que representa cerca de 65% a 70% da constituição da ME, e uma parte orgânica composta por glicoproteínas, proteoglicanos, sialoproteínas entre

outras, que representam os restantes 25% a 30% da sua constituição [4]. Algumas das mais importantes proteínas que podem ser encontradas na ME são o colagénio tipo I, osteonectina, fibronectina e osteocalcina [21-34].

Existem muitos outros aspectos importantes relacionados com a biologia óssea, tais como os processos de formação óssea, diferenças entre osso lamelar e não-lamelar e mineralização da ME, no entanto não serão abordados visto não serem relevantes no contexto científico do presente trabalho.

### ***Tratamentos de defeitos/lesões ósseas***

O osso é um tecido que apresenta uma constante taxa de remodelação estrutural. Devido à sua capacidade inata de regeneração espontânea, a grande parte das lesões ósseas tais como fracturas, podem ser tratadas através de terapias convencionais. No entanto, em caso de defeitos com dimensões elevadas e deformações ósseas congénitas, torna-se necessário o uso de enxertos ou substitutos ósseos para assistir o processo de regeneração [35].

As actuais terapêuticas são baseadas em enxertos autogénicos, alogénicos ou como alternativa no uso de implantes metálicos e cerâmicos [36-40]. Os enxertos autogénicos, ou seja, a remoção de osso de uma parte do corpo do próprio paciente (normalmente da crista ilíaca) e implante na zona afectada, tem sido a terapêutica mais utilizada ao longo dos anos devido à possibilidade de fornecer células osteogénicas e factores osteoconductivos essenciais para a regeneração/reparação óssea [39, 41]. Apesar de apresentar uma percentagem de sucesso relativamente alta, a sua aplicabilidade é restrita devida à quantidade de osso que pode ser removido do paciente, traumatismo das zonas de remoção e implante, complicações anatómicas e estruturais, e reabsorção do enxerto [36-40, 42].

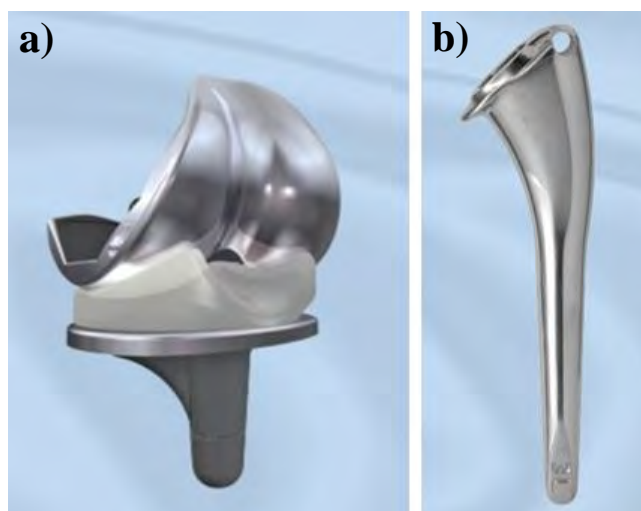
Os enxertos alogénicos (Figura 1.2) podem representar uma alternativa aos anteriores devido à possibilidade de não causarem traumatismos associados ao processo de remoção de tecido do paciente (as partes de osso a implantar são removidas de outro doador geneticamente similar). No entanto a incorporação com o tecido nativo é mais baixa comparativamente aos enxertos autogénicos. Adicionalmente, existe também a possibilidade de imuno-rejeição, transmissão patogénica do doador para o paciente,

infecções causadas pelo transplante (pouco frequente), baixa capacidade osteogénica e baixas propriedades mecânicas [36-40, 43-44].



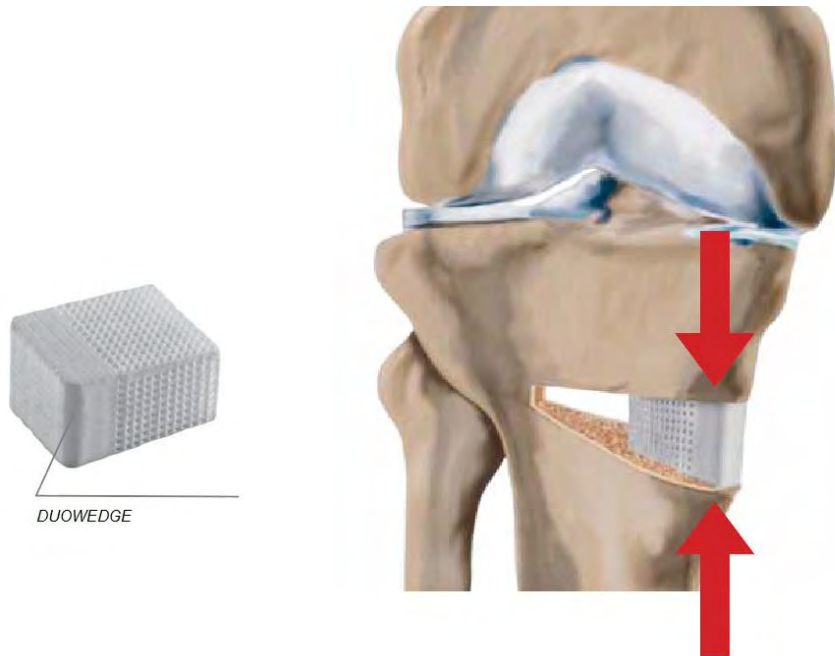
**Figura 1.2:** Enxerto alogénico da parte superior direita do fémur [45].

A utilização de implantes sintéticos (metálicos ou cerâmicos) constitui uma alternativa aos dois tipos de enxertos anteriormente mencionados [36]. Os implantes metálicos, apesar de fornecerem um imediato suporte mecânico na zona lesionada, exibem uma baixa integração com o tecido nativo além de poderem apresentar falhas irreparáveis ao longo do seu ciclo de utilização devido à fadiga mecânica (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Próteses metálicas à base de titânio. a) joelho TKA Genus; b) anca APTA Stem [46].

Por seu lado, os materiais cerâmicos (Figura 1.4) possuem uma baixa resistência à tração e são frágeis mecanicamente, o que inviabiliza a sua aplicação em zonas sujeitas a elevada torção, flexão e tensões de corte [36, 47].



**Figura 1.4:** Implante cerâmico DUOWEDGE [48].

Devido às limitações das diversas metodologias de transplante de tecidos/órgãos bem como dos implantes sintéticos acima mencionados, a Engenharia de Tecidos (ET) tem vindo a conquistar um papel de enorme relevo no campo da investigação, representando actualmente a área mais promissora na tentativa de desenvolver substitutos biológicos capazes de promover a regeneração/reparação de tecidos e/ou órgãos.

### **1.3 – Engenharia de tecidos**

O termo ET foi definido pela primeira vez em 1988 por Skalak e Fox como sendo “*a aplicação de princípios e métodos de engenharia e das ciências da vida para a compreensão das relações estrutura/função dos tecidos e para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos*” [49]. Posteriormente em 1993, Langer e Vacanti descreveram ET como sendo “*um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e ciências da vida no*

*desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de restaurar, manter ou melhorar a função de tecidos e órgãos*” [50]. Actualmente a ET tem como objectivo criar ou promover a formação de um tecido específico, numa localização específica através da selecção e manipulação de células, matrizes de suporte e estímulos biológicos [51]. Idealmente, estes substitutos biológicos devem ter propriedades funcionais, estruturais e mecânicas comparáveis às dos tecidos nativos [51]. A metodologia mais utilizada a nível de ET envolve o uso de estruturas porosas tridimensionais (*scaffolds*), biocompatíveis e biodegradáveis, em conjugação com células humanas de forma a promover a regeneração de tecidos [52]. Os requisitos essenciais que estes *scaffolds* 3D devem cumprir têm evoluído ao longo dos anos passando de simples estruturas de suporte passivo capazes de acomodar a adesão e proliferação celular, para sistemas com propriedades bioactivas (através da integração e libertação de biomoléculas) capazes de estimular a regeneração de tecidos. [53-57]. Devido à multitudine funcional dos tecidos torna-se extremamente complexo, senão mesmo impossível estabelecer os parâmetros que definem o *scaffold* “ideal”, até mesmo para um único tecido [58]. As considerações são complexas e incluem factores químicos, morfológicos, mecânicos e biológicos, assim como a sua variação ao longo do tempo. Contudo, é amplamente reconhecido o papel determinante que a dimensão e geometria dos poros desempenham em termos de adesão, migração, vascularização e crescimento de neo-tecido [54, 59-63]. Neste contexto, diversos investigadores têm reportado diferentes dimensões de poros ideais, de acordo com as diferentes linhas celulares, tecidos e biomateriais [63-66]. Independentemente da grande variabilidade que é possível observar nos resultados obtidos pelos diferentes investigadores, parece existir unanimidade no facto de que a geometria e dimensão do poro por si só não são suficientes para garantir um adequado crescimento ósseo, o qual também depende da interconectividade entre poros. Como tal, torna-se crucial o desenvolvimento de metodologias mais precisas e sistemáticas que permitam definir e estabelecer claramente espectros dimensionais de poros apropriados para o crescimento de diferentes linhas celulares e conseqüente regeneração de tecidos.

Relativamente à produção de *scaffolds* para ET, existem dois grandes grupos de tecnologias que têm vindo a ser aplicados com diferentes níveis de sucesso e que se encontram classificados em “tecnologias convencionais” e “tecnologias não-



## Capítulo 1 - Introdução

convencionais”. As tecnologias convencionais englobam lixiviação, liofilização, utilização de fluidos supercríticos, moldação e *electrospinning*. Apesar de serem aplicadas em larga escala, essencialmente devido à sua simplicidade e baixo custo do equipamento, estas técnicas apresentam inúmeras desvantagens, nomeadamente o baixo controlo dimensional e geométrico dos poros, distribuição espacial (interconectividade), uso de solventes orgânicos tóxicos e elevados tempos de produção [67-69]. Estas desvantagens acabam por ter uma influência directa no desempenho biológico e mecânico dos *scaffolds*, afectando simultaneamente o processo e o grau de regeneração dos tecidos [69-75].

De modo a superar as desvantagens anteriormente mencionadas, foram recentemente introduzidas na área biomédica as tecnologias de fabricação aditiva (AM, do inglês *Additive Manufacturing*). A utilização combinada destas tecnologias com materiais biocompatíveis e biodegradáveis, células e factores de crescimento para a produção de substitutos biológicos para ET, permitiu o desenvolvimento de um novo domínio de investigação designado de Biofabricação [76]. Esta estratégia permite a produção rápida e customizada de *scaffolds* com geometrias internas/externas complexas, alta reprodutibilidade, controlo arquitectónico e espacial, incrementando assim o transporte homogéneo de oxigénio e nutrientes através dos *scaffolds* [54, 67]. A característica comum deste grupo de tecnologias é a possibilidade de reproduzir fisicamente objectos 3D (tridimensional), camada a camada, a partir de um modelo geométrico 3D obtido a através de um *software* de desenho assistido por computador (CAD, do inglês *Computer Aided Design*) [67-69, 75, 77-80]. Existem diversas tecnologias de fabricação aditiva baseadas em diferentes princípios, como os de impressão 3D, extrusão, sinterização e estereolitografia [69, 75, 81-91]. Os materiais mais utilizados para a produção de *scaffolds* são polímeros, cerâmicos e compósitos, tanto de origem natural como sintética [92].

De acordo com a principal metodologia aplicada em ET, mencionada anteriormente, é possível, em condições apropriadas, extrair células de um doador, incluindo células estaminais adultas, expandi-las em cultura, associá-las e cultivá-las em *scaffolds in vitro*, e posteriormente proceder à sua implantação *in vivo* no local do tecido a regenerar. Actualmente o procedimento de deposição de células em *scaffolds* é manual e requer a utilização de micropipetas capazes de depositar suspensões de

elevada densidade de células. Como a técnica usada é manual e altamente dependente do utilizador, o seu controlo e reprodutibilidade é extremamente baixo estando também associado a baixas eficiências de deposição celular e distribuição heterogénea ao longo da superfície e interior do *scaffold* [93]. O processo de cultura celular é geralmente realizado em condições estáticas com baixa taxa de difusão de oxigénio e nutrientes conduzindo a um limitado crescimento de tecido no interior dos *scaffolds*. Como tal, os bioreactores têm vindo a ser aplicados com maior frequência no campo da ET. Estes equipamentos permitem obter uma elevada eficiência das estratégias de deposição e cultura celular através de uma distribuição celular homogénea no interior de *scaffolds* de grandes dimensões, condicionamento mecânico das células bem como um controlo automático e controlado dos fluxos de oxigénio e nutrientes para as células e neo-tecidos [94].

Apesar de todos os esforços que têm vindo a ser desenvolvidos, a utilização de *scaffolds* em combinação com células para regeneração de tecidos continua a ser um processo complexo que envolve no mínimo três etapas distintas, nomeadamente a produção das estruturas 3D, esterilização e deposição celular nos *scaffolds* e finalmente cultura celular do conjunto *scaffolds*-células. Uma das problemáticas desta metodologia está claramente associada ao elevado risco de contaminação das estruturas durante o processo de transferência entre as diversas etapas do processo devido às baixas condições de esterilidade existentes. Para além disso, como as etapas não se encontram integradas, não podendo ser efectuadas de forma contínua, os tempos de produção aumentam reduzindo as possibilidades de aplicação clínica directa dos produtos.

#### **1.4 – Objectivos e estrutura da tese**

O objectivo central deste trabalho de investigação foi o desenvolvimento e optimização de um equipamento de fabricação aditiva (hardware e software), baseado no princípio de extrusão multimaterial, para incorporação num novo sistema automático e integrado de produção e cultura celular *in vitro* de *scaffolds* (BioCell Printing). Este sistema deve compreender 4 zonas distintas de operação permitindo de modo sequencial, a produção de *scaffolds*/matrizes com gradientes funcionais com ou sem encapsulamento de células. As diferentes zonas de operação correspondem a:

## Capítulo 1 - Introdução

- Zona de construção por extrusão multimaterial (Zona 1);
- Esterilização das estruturas por radiação e/ou vaporização utilizando óxido de etileno (Zona 2);
- Deposição de células (Zona 3);
- Cultura celular em bioreactor (Zona 4).

Pretende-se desta forma assegurar a reprodutibilidade e continuidade do processo de produção de estruturas bioactivas, garantido as devidas condições de esterilidade entre as diversas etapas, reduzindo o tempo necessário entre a avaliação *in vitro* e a validação clínica das estruturas teciduais artificiais. Através da integração e sincronização das diferentes etapas de produção será possível reduzir substancialmente a intervenção manual eliminando as variações e erros associados ao utilizador.

São objectivos específicos deste trabalho de investigação:

1. Levantamento e caracterização das actuais tecnologias de fabricação aditiva;
2. Design e concepção de um sistema de fabricação aditiva para integração na BioCell Printing;
3. Validação da zona de construção do sistema BioCell Printing;
4. Avaliação das condições de processamento sobre as características mecânicas e biológicas de *scaffolds*;
5. Avaliação do efeito do tipo de material em termos de características mecânicas e biológicas de *scaffolds*;
6. Avaliação quantitativa e qualitativa do comportamento biológico dos *scaffolds*;
7. Avaliar o efeito da arquitectura e do material no processo de diferenciação celular demonstrando a viabilidade das estruturas produzidas em aplicações de regeneração óssea;

A tese encontra-se assim dividida em sete capítulos que descrevem de forma detalhada o trabalho desenvolvido (Figura 1.5). O primeiro capítulo introduz o tema da dissertação e apresenta os principais objectivos deste trabalho.

## **Capítulo 2 – Estado da arte**

Neste capítulo é efectuada uma descrição do conceito de ET aplicado à regeneração óssea bem como das diferentes metodologias utilizadas. Os principais temas associados a esta nova área de investigação, nomeadamente os requisitos dos *scaffolds*, biomateriais, células, tecnologias de produção e bioreactores são revistos de forma detalhada.

## **Capítulo 3 – Materiais e técnicas de caracterização.**

Os materiais utilizados na produção de *scaffolds*, nomeadamente a Policaprolactona (PCL) e a HA são descritos ao longo deste capítulo. Adicionalmente são ainda reportados e devidamente descritos os princípios de funcionamento e aplicações das diferentes técnicas utilizadas na caracterização de materiais e *scaffolds*.

## **Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – sistema BioCell Printing.**

Este capítulo reporta o trabalho efectuado ao nível do desenvolvimento de um sistema de fabricação aditiva para integração na BioCell Printing, e encontra-se dividido em duas partes. Na primeira parte é efectuada uma descrição do conceito/sistema BioCell Printing, constituído por quatro zonas distintas onde de forma sequencial é realizada a produção de *scaffolds* (zona 1), esterilização (zona 2), deposição celular (zona 3) e cultura celular dinâmica *in vitro* (zona 4). Na segunda parte são reportadas e devidamente justificadas as opções tomadas a nível de *design* e concepção do hardware e software que constituem a zona de produção de *scaffolds* (zona 1). É ainda efectuada uma validação do sistema de fabricação aditiva através da análise estrutural e morfológica de algumas estruturas porosas produzidas em PCL.

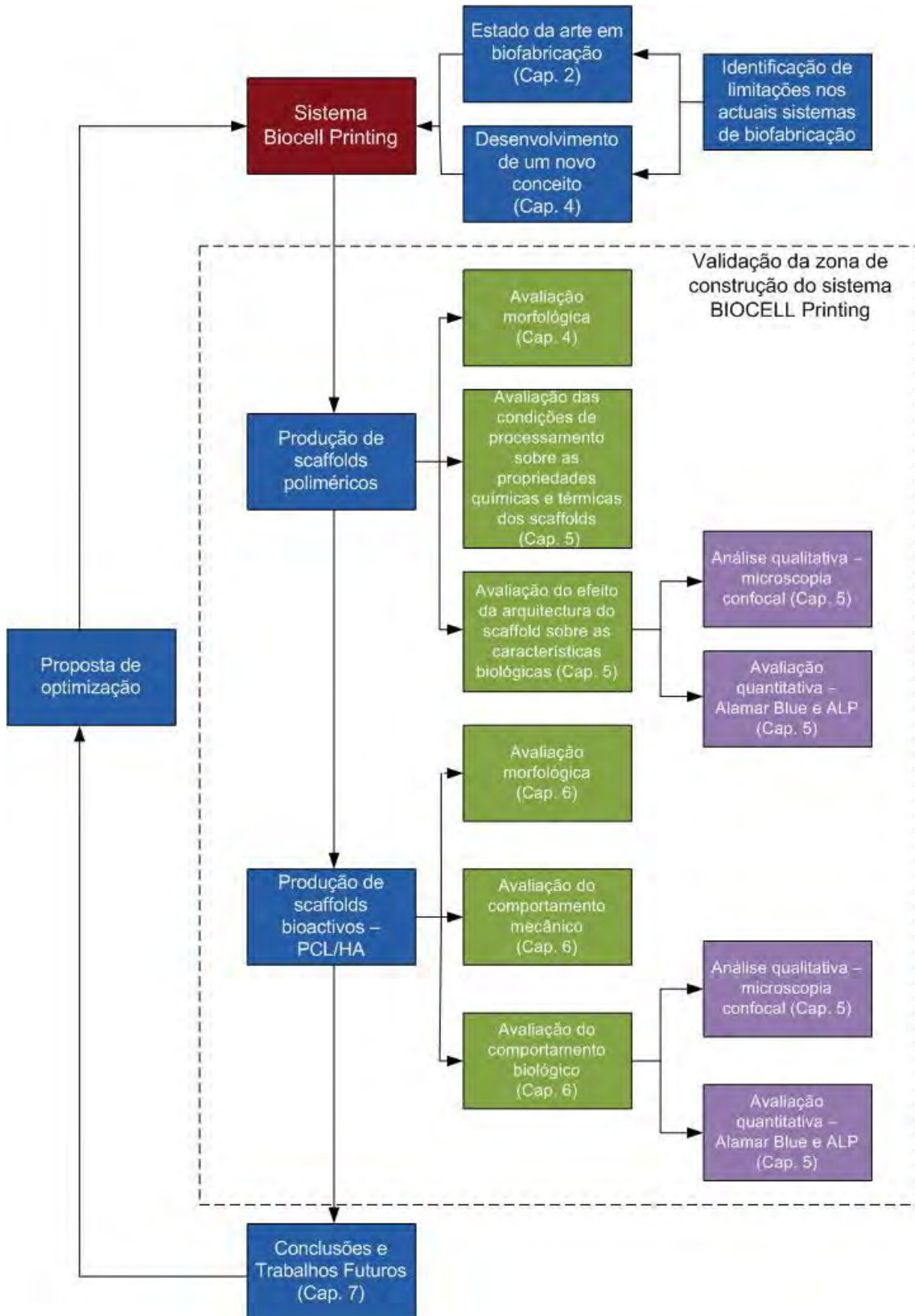


Figura 1.5: Estrutura da tese.

## **Capítulo 5 – Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de *scaffolds* em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing.**

Este capítulo descreve a metodologia utilizada na preparação e caracterização de *scaffolds* à base de PCL com diferentes geometrias e dimensões de poros. As estruturas produzidas são caracterizadas de um ponto de vista térmico (Calorimetria Diferencial de Varrimento - DSC) e químico (Cromatografia de Exclusão por Tamanho - SEC) de modo a garantir que o processo de produção (extrusão) não altera as propriedades estruturais do polímero. Posteriormente é efectuado um estudo comparativo e retiradas algumas conclusões relativamente à influência da geometria e dimensão dos poros nas propriedades morfológicas, mecânicas e biológicas das estruturas. Por fim é feita uma avaliação crítica relativa ao potencial de aplicação da BioCell Printing na produção de *scaffolds* para ET.

## **Capítulo 6 – Desenvolvimento de *scaffolds* bioactivos à base de Policaprolactona e Hidroxiapatita.**

Neste capítulo é descrito o procedimento para preparação e produção de *scaffolds* em PCL e HA com o intuito de aumentar a bioactividade das estruturas. Para tal são utilizadas dois tipos de HA com granulometria diferente e estudado o seu efeito nas propriedades mecânicas e biológicas dos *scaffolds*. As misturas são preparadas por *melt blending* e a eficiência de carregamento e homogeneidade da distribuição das partículas de HA são avaliadas com recurso a termogravimetria (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*) e Microscopia electrónica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) respectivamente. São ainda realizados testes mecânicos à compressão para determinar o efeito da adição de HA às estruturas de PCL e o efeito da granulometria no comportamento mecânico dos *scaffolds*. Por fim são utilizadas células estaminais mesenquimais humanas (hMSC, do inglês *human Mesenchymal Stem Cells*) para estudar o efeito da adição de HA na adesão, proliferação e diferenciação celular.

## **Capítulo 7- Conclusões e Trabalhos Futuros**

O objectivo deste capítulo é fazer um resumo das actividades realizadas ao longo deste trabalho, evidenciando as principais conclusões. São também apresentadas possíveis actividades a realizar no futuro com intuito de completar ou melhorar o trabalho apresentado nesta dissertação.

Deste trabalho de investigação resultaram as seguintes publicações:

### **Capítulos em livro**

Yong, M., Melchels, F., Vaquette, C., Hutmacher, D., Adam, C. Domingos, M. and Bartolo, P., 2012. In: Bártolo PJ, ed. Innovative developments in design and manufacturing - Advanced research in virtual and rapid prototyping. Taylor & Francis, 89-92.

Bártolo, P.J., Domingos, M., Patrício, T., Cometa, S. and Mironov, V., 2011. Biofabrication strategies for tissue engineering In: Fernandes P and Bártolo PJ, eds. Advances on modeling in tissue engineering. Springer. 137-176.

Domingos, M., Chiellini, F., Gloria, A., Ambrosio, L., Bartolo, P.J. and Chiellini, E., 2009. BioExtruder: Study of the influence of process parameters on PCL scaffolds properties. In: Bártolo PJ, ed. Innovative developments in design and manufacturing - Advanced research in virtual and rapid prototyping. Taylor & Francis, 67-73.

### **Artigos em Revistas com revisão internacional**

Melchels, F.P.W., Domingos, M.A.N., Klein, T.J., Malda, J., Bartolo, P.J. and Hutmacher, D.W., 2012. Additive manufacturing of tissues and organs. Progress in Polymer Science. (DOI:10.1016/j.progpolymsci.2011.11.007).

Domingos, M., Chiellini, F., Gloria, A., Ambrosio, L., Bartolo, P. and Chiellini, E., 2012. Effect of process parameters on the properties of 3D bioextruded poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds. Rapid Prototyping Journal. 18(1), 56-67.

## *Capítulo 1 - Introdução*

Domingos, M., Chiellini, F., Cometa, S., De Giglio, E., Grillo-Fernandes, E., Bártolo, P. and Chiellini, E., 2011. Evaluation of in vitro degradation of PCL scaffolds fabricated via bioextrusion – Part.2: Influence of pore size and geometry. *Virtual and Physical Prototyping*. 6(3), 157-165.

Bártolo, P.J., Domingos, M., Gloria, A. and Gay, J.C. 2011. Biocell printing: integrated automated assembly system for tissue engineering constructs. *CIRP Annals - Manufacturing Technology*. 60 (1), 271-274.

Domingos, M., Chiellini, F., Cometa, S., De Giglio, E., Grillo-Fernandes, E., Bártolo, P. and Chiellini, E., 2011. Evaluation of in vitro degradation of PCL scaffolds fabricated via bioextrusion – Part.1: Influence of the degradation environment. *Virtual and Physical Prototyping*. 5 (2), 1-9.

Domingos, M., Dinucci, D., Cometa, S., Alderighi, M., Bartolo, P.J. and Chiellini, F. 2009. Polycaprolactone scaffolds fabricated via bioextrusion for tissue engineering applications. *International Journal of Biomaterials*, Volume 2009, Article ID 239643, 9 pages.

Domingos, M., Chiellini, F., Cometa, S., Dinucci, D., Bartolozzi, I., Bártolo, P. and Chiellini, E., 2009. Solid freeform fabrication and in vitro characterization of 3D polycaprolactone based scaffolds for tissue engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6 (12).

Domingos, M., Chiellini, F., Bartolo, P.J. and Chiellini, E., 2008. Polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications fabricated via bioextrusion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62 (8), 490.

Este trabalho de investigação foi parcialmente suportado pelos seguintes projectos de investigação:



## Capítulo 1 - Introdução

- **BIOMAS** - Biomanufacturing and Engineering of Scaffolds. Projecto em Co-promoção no âmbito do Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN) financiado pela Agência de Inovação.
- **μSTL** - Micro-Stereo-Thermo-Lithography. Projecto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (PTDC/EME-PME/098037/2008).
- **Projecto estratégico** - Projecto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).
- **Development of PCL-based scaffolds plus rhBMP-2 for sheep thoracic spine fusion and tibia defects** – Projecto de investigação em colaboração com a Universidade de Queensland, Austrália.

## Capítulo 2 – Estado da arte

---

Ao longo deste capítulo será efectuada uma revisão bibliográfica da regeneração de tecidos baseada no uso de *scaffolds*. Especial atenção será dada a aspectos relacionados com os requisitos biomecânicos dos *scaffolds*, biomateriais, células, tecnologias de produção e bioreactores. No final do capítulo são apresentadas algumas conclusões relativas ao estado da arte da ET bem como tecnologias de produção de *scaffolds*.

### 2.1 – Regeneração de tecidos baseada no uso de *scaffolds*

A ET representa uma abordagem completamente inovadora através da qual órgãos e tecidos podem ser reparados, substituídos ou regenerados, através da utilização de substitutos biológicos. Para além de representar uma alternativa viável às actuais terapêuticas médicas de tratamento de defeitos ou lesões ósseas permite ainda dar resposta a determinadas necessidades clínicas que não podem ser colmatadas por intermédio da doação de tecidos/órgãos isoladamente (ver Capítulo 1).

Esta é uma área multidisciplinar, emergente, de investigação e desenvolvimento tecnológico que possui o potencial de revolucionar o nosso actual serviço de saúde e melhorar drasticamente a qualidade de vida de milhões de pessoas a nível mundial.

Contrariamente à clássica abordagem relacionada com o uso de implantes artificiais, a ET baseia-se no conhecimento dos processos de formação e regeneração de tecidos, tendo como objectivo primário a indução/formação de novos tecidos funcionais [95]. Existem três estratégias que têm sido adoptadas em ET que incluem:

- **Uso de células isoladas ou substitutos celulares:** esta estratégia compreende a implantação directa *in vivo* de células isoladas ou substitutos celulares com o intuito de promover a síntese de matriz extra celular (ME). Esta metodologia permite evitar as complicações associadas às cirurgias, promove a substituição selectiva das células danificadas incapazes de desempenhar as funções requeridas e possibilita a manipulação celular pré-administração *in vivo*. As principais limitações incluem a incapacidade das células manterem a sua

funcionalidade pós-implantação, rejeição imunológica, e dimensão do defeito/lesão pois está limitada a pequenos defeitos.

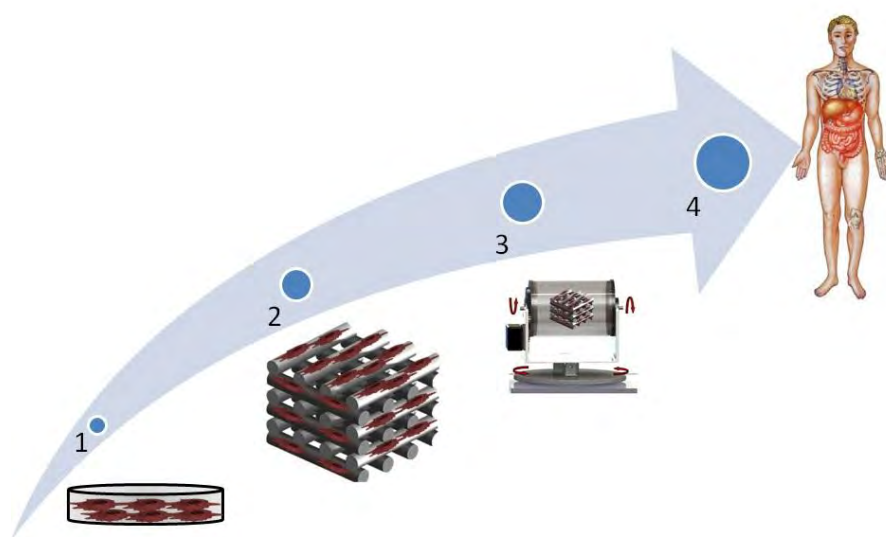
- **Uso de scaffolds isolados:** esta estratégia pressupõe a implantação *in vivo* de *scaffolds* isolados e assenta na capacidade destas estruturas porosas em promoverem a migração de células dos tecidos nativos adjacentes para o interior dos *scaffolds*. As estruturas poliméricas podem conter factores de crescimento ou outros agentes terapêuticos que promovam o aumento da adesão, proliferação e diferenciação celular. Através desta metodologia é possível eliminar os problemas relacionados com a origem das células. No entanto esta estratégia é altamente condicionada pelo processo de recrutamento celular a partir dos tecidos nativos.
- **Uso combinado de scaffolds e células:** esta estratégia baseia-se na utilização de um *scaffold* temporário capaz de promover um ambiente biomecânico adequado para a adesão, proliferação e diferenciação celular. Neste caso, as células são extraídas do corpo humano, expandidas em cultura e finalmente depositadas e cultivadas *in vitro* nos *scaffolds*. Após uma fase inicial de adesão e proliferação no substrato (*scaffold*) as células começam a depositar a sua própria matriz extra celular estimulando a formação de um novo tecido. Durante este processo o *scaffold* vai-se degradando sendo finalmente eliminado pelo organismo.

Esta última estratégia é a mais utilizada a nível de ET pois permite a manipulação experimental a três níveis distintos, nomeadamente células, materiais e técnicas de produção de *scaffolds*. As células utilizadas nesta estratégia são obtidas a partir de tecidos vivos removidos a partir do próprio paciente (autogénicas) ou a partir de outra pessoa (alógenicas), depositadas em *scaffolds* 3D e cultivadas *in vitro* de modo a obter um implante biológico para transplantação. Esta estratégia pode ser aplicada com inúmeras variações, que dependem essencialmente da origem das células, do biomaterial do *scaffold*, condições e duração da cultura celular, tipo e propriedades do tecido a regenerar. Comparada com a transplantação de células isoladas, a combinação de células e *scaffolds* apresenta a vantagem de permitir a produção de um

substituto biológico com propriedades funcionais imediatas. Após implantação, este substituto deve ser capaz de se integrar com os tecidos nativos adjacentes garantindo um nível progressivo de funções até completa restauração funcional do tecido danificado. Os aspectos a considerar na regeneração de um neo-tecido, nomeadamente do ponto de vista biológico, são muito variados e complexos, incluindo células, ME, comunicação intercelular, interacção matriz-células e factores de crescimento. A chave do sucesso da ET reside efectivamente na capacidade de combinar espacialmente e temporalmente, de forma coordenada, todos os aspectos biológicos, mecânicos e químicos relacionados com o tecido a regenerar e respectivo substituto biológico a produzir.

### **Scaffolds**

A metodologia mais utilizada em ET envolve a deposição de *scaffolds* 3D, porosos, biocompatíveis/biodegradáveis com células do paciente de forma a promover a regeneração de tecidos (Figura 2.1).

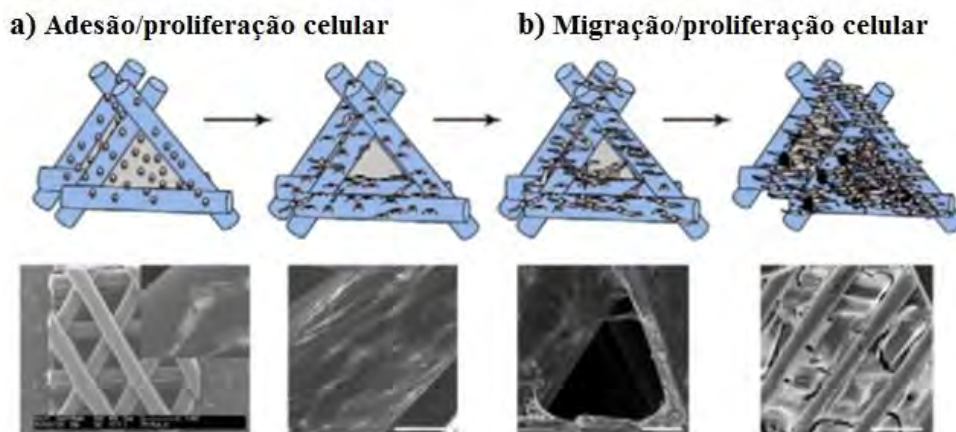


**Figura 2.1:** Etapas relevantes da metodologia baseada no uso de *scaffolds* para ET. 1) Isolamento e expansão de células do paciente em cultura; 2) Deposição celular em *scaffolds* 3D; 3) Cultura dinâmica (bioreactor) do sistema *scaffold*+células; 4) Implante do sistema no paciente.

A maioria das linhas celulares utilizadas em ET é dependente de pontos de ancoragem, ou seja, de um *template* de suporte. Por esta razão, os *scaffolds* desempenham uma função crucial em todo este processo, seja *in vitro* ou *in vivo*, representando o suporte biomecânico inicial para adesão, proliferação e diferenciação celular. A sua capacidade de retenção e entrega controlada de células e factores bioactivos, adequada difusão de nutrientes celulares, oxigénio e vascularização são aspectos fundamentais num adequado processo de regeneração tecidual [54, 76, 96-99].

Muitas vezes a terminologia utilizada no campo da ET e biomateriais é confusa e pode levar a interpretações incorrectas, nomeadamente a nível da distinção entre *scaffold* e matriz. De modo a clarificar esta situação tem vindo a ser proposto que os hidrogéis sejam definidos como matrizes e os sólidos celulares como *scaffolds* [100].

Os hidrogéis são constituídos por redes poliméricas insolúveis ou solúveis em água, reticulados, e frequentemente (no campo dos biomateriais) concebidos na forma de géis colóides nos quais a água actua como meio dispersivo. Contrariamente, e tendo por base a terminologia de engenharia, os *scaffolds* são definidos como sólidos celulares [101]. Devido à sua elevada dimensão de poros (micrómetros ou milímetros) comparativamente com as matrizes (micrómetros ou nanómetros), os *scaffolds* têm sido propostos por alguns autores como superfícies curvas 2D adequadas à cultura celular [100, 102]. No entanto, este argumento apenas é válido na fase inicial de adesão e proliferação celular (Figura 2.2a) que ocorre na superfície dos *scaffolds*. Após o revestimento da superfície e preenchimento dos poros por células e ME, então os *scaffolds* passam a representar um verdadeiro ambiente 3D. Desta forma a porosidade inicial dos *scaffolds* passa a ser preenchida na totalidade por ME produzida pelas células (Figura 2.2b) [103].



**Figura 2.2:** Interpretação esquemática da adesão e proliferação celular em *scaffolds* de PCL/TCP (fosfato tricálcico) (a), seguida da formação de neo-tecido. As imagens SEM permitem observar claramente que os osteoblastos em combinação com a matriz mineral migram para o interior do *scaffold* antes de cobrirem a totalidade dos poros [103].

Devido à multifuncionalidade dos tecidos humanos torna-se extremamente complexo, senão mesmo impossível, definir os parâmetros de um *scaffold* ideal, mesmo para um único tecido [58].

As considerações são complexas e incluem factores químicos, morfológicos, mecânicos e biológicos, cujas características variam com o tempo. De qualquer modo parece existir um consenso alargado no que se refere aos requisitos essenciais [54, 76, 96, 98]:

- **Biocompatibilidade:** O material, pré e pós-processamento, deve interagir positivamente com o ambiente biológico de modo a não provocar reacções inflamatórias por parte do organismo. A implantação de um *scaffold* pode desencadear uma série de eventos por parte do organismo que funcionam como resposta à presença de um organismo estranho. A típica inflamação inicial pode, em alguns casos, levar a uma inflamação crónica que por sua vez poderá promover o desenvolvimento de uma cápsula fibrosa e consequente falha do implante [104]. A extensão e intensidade da resposta inflamatória depende de muitos factores, nomeadamente da dimensão da lesão, propriedades biomecânicas do implante, arquitectura interna e externa,

propriedades superficiais e porosidade [105]. O nível de desvio em relação ao normal processo de regeneração tecidual determina o nível de biocompatibilidade dos materiais [106].

- **Biodegradabilidade:** A taxa de degradação dos *scaffolds* deve ser controlada e corresponder à taxa de regeneração dos tecidos nativos, sendo que os produtos resultantes deste mesmo processo de degradação devem ser não-tóxicos para as células. Idealmente, à medida que o *scaffold* se degrada, as células vão depositando a sua própria ME que eventualmente dará origem a um ambiente biomimético 3D com uma estrutura idêntica à do tecido nativo. O processo de degradação *in vivo* é influenciado por diversas variáveis que compreendem propriedades do material (composição química, peso molecular e distribuição molecular, cristalinidade, morfologia, etc.), características macroscópicas (dimensão e forma do implante, porosidade, etc.) e características do meio (temperatura, pH do meio, presença de enzimas ou células e tecidos). O controlo do processo e dos efeitos dos seus produtos de degradação são absolutamente cruciais, pois um abaixamento do pH local (causado pela libertação de produtos de degradação ácidos) pode causar inflamação ou necrose. Existem diversos estudos científicos que reportam os mecanismos e cinéticas de degradação de *scaffolds* produzidos a partir de diferentes materiais, utilizando várias tecnologias de produção [107-109].
- **Porosidade, micro e macro-estrutura:** Porosidade é definida como a percentagem de espaços vazios no interior de um corpo sólido e é independente do material [110]. De um modo geral, é necessário que as estruturas apresentem uma elevada percentagem de porosidade. Tal, permite um aumento da área superficial, que por consequência possibilita uma melhor eficiência no processo de adesão, migração e proliferação celular bem como neovascularização [111]. Adicionalmente, uma estrutura com porosidade adequada permite um correcto acoplamento entre o implante e o tecido nativo na zona da lesão, assegurando a estabilidade do implante e evitando o encapsulamento fibroso [112]. De qualquer forma, a porosidade por si só não é garantia de sucesso do implante. Uma dimensão e geometria apropriada do

poro (geralmente entre os 100  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$  dependendo do tecido) associada a uma estrutura com uma rede interna de canais 100% interconectada são parâmetros chave em termos de viabilidade celular e regeneração de tecidos. No caso específico de implantes sujeitos a elevados esforços mecânicos, como é o caso do tecido ósseo, é necessário ter em atenção o equilíbrio entre a porosidade necessária para acomodar o máximo número de células possível e as propriedades mecânicas do implante para que não haja uma falha estrutural. O aumento da porosidade, com correspondente aumento da área superficial da estrutura, benéfica em termos biológicos, corresponde a uma diminuição das propriedades mecânicas da estrutura [113].

- **Dimensão e geometria do poro:** A dimensão do poro é muito importante no processo de adesão/migração celular, vascularização e crescimento de neo-tecido [54, 59, 61-63]. De acordo com a literatura, é possível encontrar diversas dimensões de poros, consideradas ótimas, em função das diferentes linhas celulares, materiais e tecidos [64-66]. A colonização celular de *scaffolds* é altamente dependente da capacidade que as células possuem de formarem pontes e “atravessarem” os poros, migrando para o seu interior. Se os poros possuírem uma dimensão demasiado elevada ou demasiado pequena, as células não conseguirão proliferar e formar redes celulares ao longo do *scaffold*. Por consequência torna-se essencial conseguir definir um espectro de dimensões ótimas de poros capazes de suportar o crescimento celular e tecidual [114]. De certa forma, parece razoável que o estabelecimento de um limite mínimo e máximo para a dimensão dos poros possa estar relacionado com a dimensão das células e a distância máxima que estas conseguem atravessar. Apesar de alguma variabilidade encontrada nestes limites, devido sobretudo ao tipo de linha celular e condições de cultura, podemos afirmar que estes se encontram num intervalo de valores entre 100  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$  [63,65-66, 114]. Poros de menores dimensões aumentam a adesão e diferenciação celular *in vitro*, enquanto poros maiores promovem uma maior adesão e viabilidade celular *in vivo*. Adicionalmente, a permeabilidade do *scaffold* (que assegura os meios para o transporte de nutrientes para as células e remoção de produtos



de actividade metabólica) pode ser definida através da combinação de cinco parâmetros: porosidade, dimensão e distribuição dos poros, tortuosidade (interconectividade), dimensão dos canais e distribuição e orientação dos poros [115-116]. O'Brien [117] estudou o efeito da dimensão dos poros de *scaffolds* de colagénio-glicosaminoglicanos (GAGs) na adesão celular. Os resultados obtidos permitiram retirar duas importantes conclusões: a fracção de células viáveis que aderiam aos *scaffolds* diminuía à medida que se aumentava o diâmetro dos poros; o número de células viáveis aumentava linearmente com o aumento da área superficial específica. Mais recentemente, os mesmos autores conduziram um estudo sobre o efeito da dimensão dos poros na permeabilidade de *scaffolds* de colagénio para ET. Os resultados experimentais e matemáticos revelaram que a permeabilidade aumenta com o aumento da dimensão dos poros e diminuí com a extensão à compressão [116].

- **Resistência mecânica:** Os implantes devem ser capazes de suportar tanto as tensões resultantes da manipulação *in vitro* como aquelas geradas pelos tecidos nativos. Durante a cultura *in vitro* as estruturas devem conseguir manter as suas propriedades mecânicas de modo a preservar o espaço necessário para o crescimento celular e formação da ME. No caso de aplicações *in vivo* é crucial que os *scaffolds* apresentem propriedades mecânicas idênticas às dos tecidos nativos proporcionando, temporariamente, um adequado suporte mecânico para a regeneração de tecidos. Inicialmente o *scaffold* deve conseguir suportar todas as tensões existentes no ambiente biológico nativo e posteriormente, de forma gradual, transferir essas mesmas tensões para o tecido regenerado. Consequentemente, no caso de materiais e estruturas poliméricas, a taxa de degradação representa um aspecto fundamental a ter em conta. Se a degradação ocorrer demasiado rápida, pode existir uma transferência prematura das tensões fisiológicas para o tecido em regeneração, levando a uma falha mecânica do dispositivo. Por outro lado, no caso de materiais com uma baixa taxa de degradação, pode acontecer uma obstrução do normal processo de regeneração celular e tecidual, causada pela ausência de estimulação mecânica dos tecidos nativos.

- **Macro geometria externa:** O bom acoplamento biomecânico entre o *scaffold* e o tecido nativo no local de implantação só pode ser alcançado se o *scaffold* possuir uma adequada dimensão e geometria externa, proporcionando uma correcta distribuição de tensões na interface *scaffold*/tecido [54, 76, 98, 106-107].
- **Fácil produção e esterilização:** Os implantes devem ser rapidamente produzidos com elevada precisão e reprodutibilidade. O processo de esterilização deve ser simples e efectuado através da exposição a altas temperaturas, exposição a agentes químicos (Óxido de etileno ou CO<sub>2</sub> supercrítico) ou através de processo físicos (radiação UV,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) sem alteração das propriedades bioquímicas do material/estrutura.
- **Topografia superficial:** A rugosidade superficial pode desempenhar um papel importante na adesão, proliferação, diferenciação e vitalidade celular. A escala (nano ou micro), forma, (cristas, degraus, estrias, pilares, etc.) e orientação da topografia deste tipo de dispositivos poderá ter um controlo efectivo sobre o comportamento e expressão do fenótipo celular [118]. De um modo geral, nano-topologias (10-300 nm) localizadas na superfície dos implantes aumentam a adesão e proliferação celular. Contudo, estas conclusões não podem ser generalizadas para todos os tipos de linhas celulares. Resultados obtidos através de experiências realizadas com nanotubos sólidos de carbono revelaram que os osteoblastos usados aderiam em maior quantidade comparativamente aos fibroblastos, condrócitos e células musculares [119]. Apesar de não ser ainda completamente claro, pensa-se que a nano-topologia modula as forças interfaciais entre as células e os implantes. Como consequência, estas mesmas forças irão regular a formação do citoesqueleto e organização dos receptores das membranas celulares, desencadeando uma complexa série descendente de sinalizações moleculares [120].  
As interacções intercelulares e consequente migração e proliferação celulares podem também ser limitadas ou potencializadas através da rugosidade superficial. Se o nível desta rugosidade for excessivamente acentuado, as células não serão capazes de estabelecer interconexões e consequentemente a

sua proliferação/migração celular estará seriamente comprometida. As propriedades superficiais dos *scaffolds* e as interações estabelecidas entre as células e a ME são de importância capital em termos de sinalização celular e consequente adesão, proliferação e expressão fenotípica [121-123]. A modificação superficial de polímeros constitui actualmente uma ferramenta muito útil no aumento da biofuncionalidade de *scaffolds*, criando ou aumentando locais específicos para adesão/imobilização de ligantes bioactivos com capacidade de regular respostas celulares específicas [114, 124-125]. Processos de modificação via plasma têm vindo a ser utilizados com maior frequência em aplicações biomédicas, mais especificamente na modificação das propriedades superficiais de materiais, devido à possibilidade que apresentam de modular, de forma controlada, a densidade superficial de diferentes grupos funcionais sem alteração das propriedades mecânicas dos materiais [126-127]. Independentemente do processo de plasma utilizado (*grafting* com gases não-polimerizáveis como o O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>, ou com monómeros orgânicos, tal como a alilamina, acrilamida e ácido acrílico), substratos que apresentem uma superfície com grupos polares (ex. NH<sub>2</sub>, COOH, OH, etc.), podem por si só conseguir aumentar a bioactividade do substrato e melhorar a adesão e proliferação celular [128-131]. Tal como previamente mencionado, os processos de modificação via plasma podem também ser muito úteis em termos de imobilização e deposição de biomoléculas, nomeadamente enzimas, peptídeos, proteínas, polissacarídeos entre muitos outros [132]. O processo consiste na modificação de substratos via plasma, criando na sua superfície grupos funcionais específicos onde posteriormente estas moléculas poderão aderir [133-135]. Um outro método para aumentar a bioactividade dos *scaffolds* é através da incorporação de factores de crescimento (GF, do inglês *Growth Factor*), capazes de guiar e controlar o comportamento celular durante o processo de regeneração dos tecidos. Estas moléculas sinalizadoras pertencem a um grupo de proteínas de origem natural capazes de aderir a locais específicos e influenciar a proliferação, diferenciação celular e estimular o processo de angiogénese. De um modo geral a entrega

controlada de GF utilizando *scaffolds*, pode ser conseguida por deposição do GF na superfície interna/externa da estrutura 3D ou então por aprisionamento físico no interior da própria estrutura [136]. Existe uma grande variedade de materiais poliméricos naturais e sintéticos que têm sido utilizados na produção de *scaffolds* para entrega controlada de fármacos, especialmente na engenharia de tecidos ósseos e cartilagosos. Os GF mais comuns e mais aplicados em ET de osso e cartilagem são factores de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*) [137-140], factores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF, do inglês *Platelet Derived Growth Factor*) [140-144], factores de crescimento nervoso (NGF, do inglês *Nerve Growth Factor*) [145-147], factores de crescimento transformadores (TGF, do inglês *Transforming Growth Factor*) [148-151], diferentes proteínas morfogénicas ósseas (BMP's, do inglês *Bone Morphogenetic Proteins*) [152-155] e factores de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês *Fibroblast Growth Factor*) [156-157]

As estratégias de ET baseadas em *scaffolds* são fortemente dependentes do material seleccionado e do processo tecnológico utilizado na sua produção. Geralmente na área de ET têm sido utilizadas quatro classes de biomateriais: materiais poliméricos de origem natural (ex. colagénio, gelatina, amido, alginato e quitosano), materiais poliméricos de origem sintética (ex. ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), PCL, matrizes teciduais não-celulares (submucosa da bexiga e de intestino), e cerâmicos (ex. hidroxiapatita e beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)) [59, 158-162]. Tanto os materiais de origem natural como as matrizes teciduais não-celulares apresentam a vantagem de promover o reconhecimento biológico por parte do organismo [162]. Os polímeros sintéticos podem ser produzidos em larga escala com propriedades, taxa de degradação e microestrutura controladas. Recentemente tem vindo a ser explorado um novo grupo de materiais correspondente a metais biodegradáveis nos quais se integra a utilização de Magnésio (Mg). Estes materiais têm permitido a produção de *scaffolds* magnéticos cujo objectivo é a

indução de orientação celular e estimulação magnética do processo de diferenciação celular [163].

## 2.2 – Biomateriais para produção de *scaffolds*

Os desenvolvimentos verificados nas últimas décadas a nível da ciência de biomateriais têm tido um impacto tremendo na comunidade científica, especialmente no campo da ET. A combinação de células, moléculas bioactivas e *scaffolds*, constitui a estratégia mais utilizada em ET de forma a promover a reparação e regeneração de tecidos. Dos *scaffolds* é esperado que consigam suportar a adesão, migração e diferenciação celular, direccionando o desenvolvimento do tecido requerido. Paralelamente à formação de neo-tecido, o *scaffold* pode sofrer degradação através da libertação de subprodutos que tanto podem ser excretados directamente pelo organismo ou metabolizados celularmente. Como tal, torna-se evidente o papel crucial que o *scaffold* desempenha na ET, bem como a quantidade e complexidade das considerações a ter no design destas estruturas nomeadamente a nível dos materiais, arquitectura, mecânica estrutural, propriedades superficiais, propriedades e produtos de degradação, adição de factores biológicos, e obviamente a variação de todos estes parâmetros ao longo do tempo. No entanto, grande parte do sucesso, em termos de desempenho funcional destas estruturas, depende claramente do material escolhido para a sua produção e da interacção que este material poderá ter com o tecido nativo. Neste contexto é importante introduzir a definição de biocompatibilidade de materiais, a qual determina o desempenho funcional de um determinado material pós-implantação. Segundo a Sociedade Europeia de Biomateriais (ESB, do inglês *European Society for Biomaterials*) “um biomaterial é um material destinado a interagir com sistemas biológicos de modo a avaliar, tratar, ampliar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo humano” [164]. Diversos biomateriais de origem natural e sintética têm vindo a ser investigados no âmbito da produção de *scaffolds/matrices* para regeneração de tecido ósseo (Tabela 2.1). De entre todos estes materiais destacam-se os polímeros de origem natural (ex. gelatina, fibrina, colagénio e ácido hialurónico), polímeros sintéticos biodegradáveis e bioabsorvíveis (ex. PCL, PLGA, PHAs (Polihidroxialcanoatos), e PUs (Poliuretanos)) e cerâmicos (Biovidro, Fosfatos de Cálcio) [78, 165]. Actualmente existe um grande interesse no

desenvolvimento de compósitos poliméricos à base de materiais cerâmicos com o intuito de aumentar de modo significativo as propriedades mecânicas e as características bioactivas dos *scaffolds* [166-170].

**Tabela 2.1:** Biomateriais para produção de *scaffolds*/matrizes para regeneração óssea.

	Material	Módulo Young (GPa)	Degradação	Processamento	Referências
<b>Polímeros Sintéticos</b>	Policaprolactona (PCL)	0,4	Hidrólise; 1 a 4 anos	Extrusão, SLS, Electrospinning, Solvent Casting	[52,171-175]
	Ácido Poliglicólico (PGA)	7,0	Hidrólise; 6 a 12 semanas	Extrusão, Solvent casting, Electrospinning	[171,176-178]
	Ácido Poliláctico (PLA)	2,7	Hidrólise; 12 a 18 semanas	Extrusão, SLA, Solvent Casting, Electrospinning	[171, 178-181]
	Polipropileno Fumarato (PPF)	2-3	Hidrólise; >12 semanas	SLA	[171, 182]
	Polihidroxialcanoatos (PHAs)	4	Hidrólise; > 1 ano	Electrospinning, Solvent casting	[171, 183-187]
	Polianidridos (PA)	$4,5 \times 10^{-2}$	Hidrólise; 1 a 14 semanas	Moldação por compressão	[171, 187-189]
	Polifosfazenos (PF)	$3,14 \times 10^{-2}$ a $4,55 \times 10^{-1}$	Hidrólise; 1 semana a 2 anos	Sinterização, Electrospinning	[190-1193]
	Poliuretanos (PU)	$1,6 \times 10^{-3}$ a $1,63 \times 10^{-2}$	Hidrólise/Enzimática; > 8 semanas	Electrospinning, Solvent Casting, Extrusão	[187, 194-196]

**Tabela 2.1 (cont.):** Biomateriais para produção de *scaffolds*/matrizes para regeneração óssea.

	Material	Módulo Young (GPa)	Degradação	Processamento	Referências
<b>Polímeros Naturais</b>	Ácido Hialurónico	2x10 <sup>-6</sup> a 1x10 <sup>-4</sup>	Enzimática; 1 a 38 dias	Fotopolimerização, HYAFF 11, Electrospinning	[197-200]
	Colagénio	1 a 1,5	Enzimática; > 1 hora	Electrospinning, CO <sub>2</sub> Crítico/SFF	[201-204]
	Fibrina	1x10 <sup>-3</sup> a 1x10 <sup>-2</sup>	Enzimática; dias a várias semanas	Moldação/Casting;	[205-206]
	Gelatina	3,6x10 <sup>-3</sup> a 12x10 <sup>-3</sup>	Enzimática; dias	Electrospinning; Extrusão, Freeze drying	[207-211]
<b>Cerâmicos</b>	Biovidro	35	Dissolução/Reabsorção osteoclástica; > 1 ano	Electrospinning; Formação directa/indirecta de espumas	[190, 212-215]
	Fosfatos de Cálcio	70 a 120	Dissolução/Reabsorção osteoclástica; > 6 meses	Electrospinning, Extrusão, SLA, 3DP	[169-170, 216-220]

## 2.3 – Células

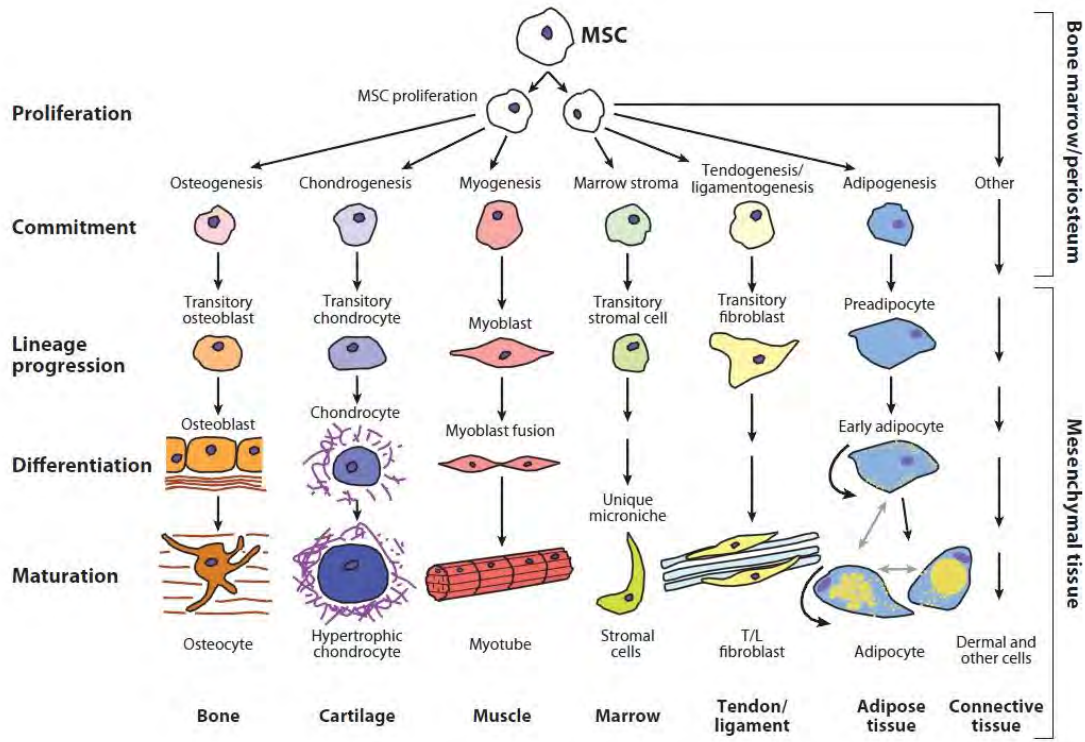
As linhas celulares com potencial aplicação em ET devem, idealmente, possuir a capacidade de proliferar e de se diferenciar *in vitro*, de uma forma controlável e reprodutível. Os requisitos relativos à cultura *in vitro* dos substitutos biológicos (suplementos do meio de cultura, estrutura e cinética de degradação das estruturas) bem como a sua funcionalidade *in vivo* (potencial de integração), podem variar de acordo com o tipo de célula. Os requisitos gerais que estas linhas celulares devem cumprir são:

- Isolamento celular e/ou selecção a partir de um determinado tecido;
- Proliferação *in vitro* de forma a obter uma massa celular suficiente para colonizar *scaffolds* 3D de grandes dimensões;
- Capacidade de diferenciação em diferentes tecidos funcionais (Figura 2.3). A diferenciação é altamente afectada pela sinalização da matriz extra celular;

As células estaminais embrionárias, ou seja, células pluripotentes com a capacidade única de dar origem a qualquer tecido do organismo, representam a mais recente descoberta ao nível das linhas celulares para ET. No entanto, os investigadores ainda estão longe de conseguir controlar o processo de diferenciação destas células em cultura.

Adicionalmente, a investigação com células estaminais embrionárias vem também levantar diversos problemas ao nível ético, político e legislativo. Estas problemáticas têm conduzido à pesquisa de fontes alternativas de células para ET, nomeadamente células mesenquimais estaminais humanas (hMSC, do inglês *human Mesenchymal Stem Cells*). As hMSC podem ser isoladas a partir de diferentes tecidos humanos inclusive medula óssea, músculo, tecido adiposo e derme. De acordo com o tipo de estímulos e condições de cultura aplicados, as hMSC podem dar origem a diferentes tipos de tecido conjuntivo, nomeadamente osso, cartilagem, músculo, etc. (Figura 2.3).

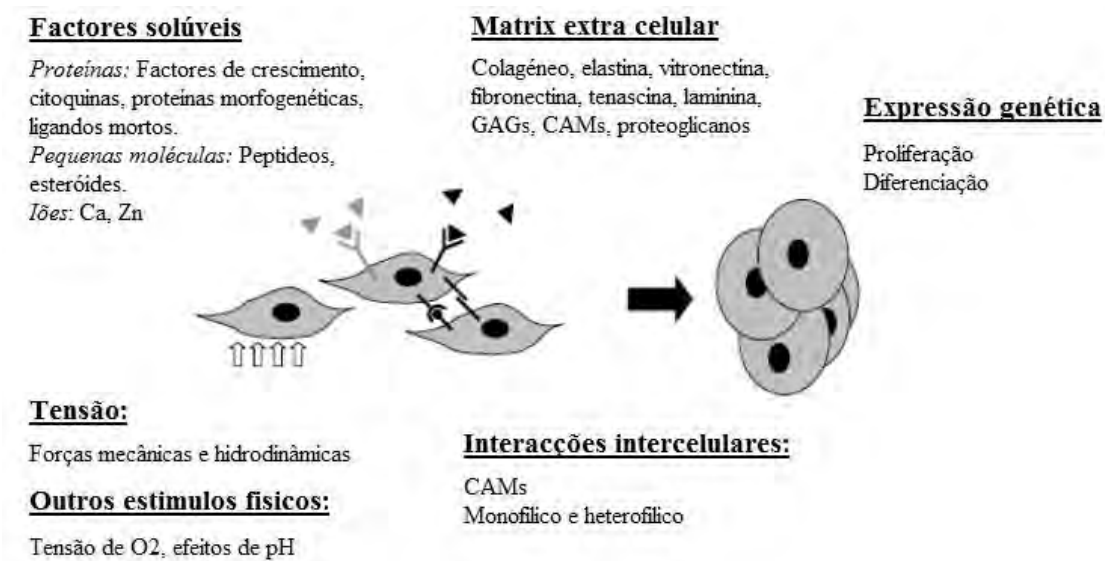




**Figura 2.3:** Células estaminais: diferenciação de hMSC em diferentes linhas celulares e tecidos humanos [221].

O crescimento e diferenciação de muitas das diferentes linhas celulares humanas são regulados por quatro classes principais de estímulos externos (Figura 2.4):

- Factores de crescimento e diferenciação solúveis;
- Natureza e organização dos constituintes solúveis/insolúveis da matriz extra celular;
- Interações intercelulares;
- Tensões ambientais induzidas pelo fluxo de fluidos e/ou estímulos mecânicos, tensão e pH;



**Figura 2.4:** Modulação celular através de factores extrínsecos [222].

No caso do tecido ósseo, os processos de formação, manutenção e reabsorção resultam da interacção de três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Cada um deste tipo de células tem uma função específica bem definida e de extrema relevância para a manutenção de um tecido ósseo saudável. Na Tabela 2.2 indicam-se algumas das principais características e funções destas células.

**Tabela 2.2:** Tipos de células ósseas e respectivas funções.

<b>Tipo de célula</b>	<b>Características morfológicas</b>	<b>Função</b>
<b>Osteoblastos</b>	Forma cubóide (localizadas à superfície do osso)	Síntese e regulação do processo de deposição e mineralização da matriz extra celular óssea
<b>Osteoclastos</b>	Células multinucleadas	Reabsorção óssea
<b>Osteócitos</b>	Forma estrelar (com mais organelos que os osteoblastos)	Calcificação da matriz óssea

## 2.4 Tecnologias de produção de *scaffolds*

O comportamento mecânico, químico e biológico dos *scaffolds* dependem, numa primeira instância, das propriedades intrínsecas dos biomateriais utilizados para a sua produção. No entanto, o processo utilizado na produção dessas estruturas têm igualmente uma influência determinante no seu desempenho *in vitro* e *in vivo*.

Ao longo dos anos têm sido desenvolvidas diversas tecnologias com o objectivo de produzir *scaffolds* com propriedades adequadas para aplicação em ET. Actualmente é possível identificar e classificar as tecnologias existentes em dois grandes grupos: tecnologias convencionais e tecnologias não-convencionais.

### 2.4.1 Tecnologias convencionais

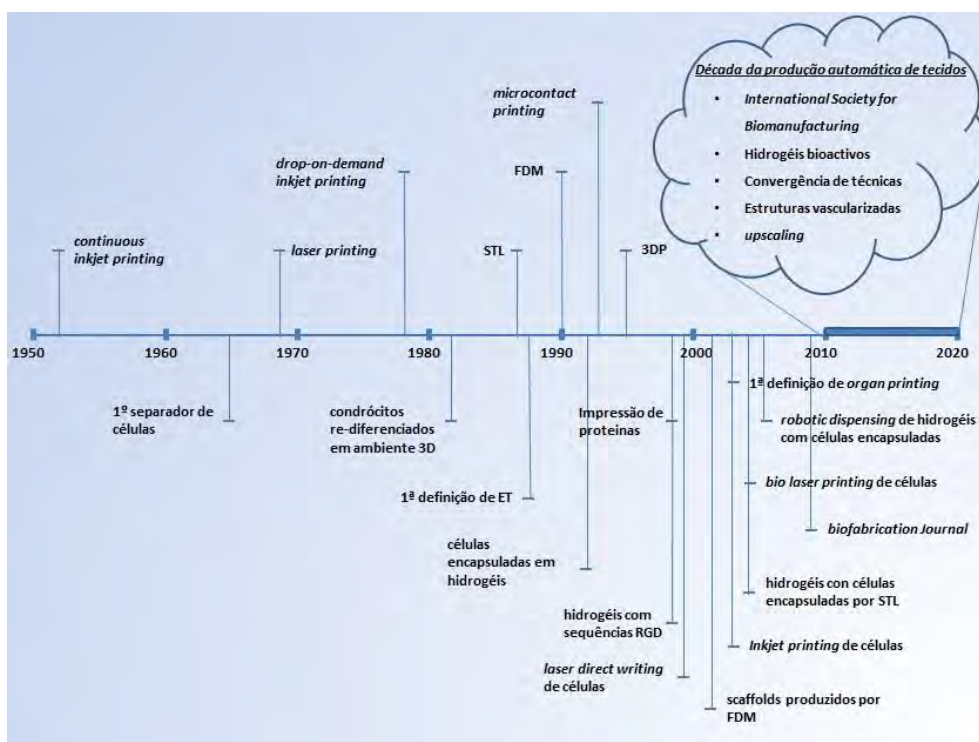
As tecnologias convencionais representam o conjunto de técnicas mais antigas utilizadas na produção de *scaffolds* para ET. A sua utilização tem sido efectuada em larga escala a nível mundial, por diferentes grupos e com relativo sucesso. Estes métodos incluem [54, 175, 223-225]:

- Lixiviação;
- Liofilização;
- Utilização de fluidos supercríticos;
- Moldação;
- *Electrospinning*;

Estes processos, embora simples do ponto de vista de implementação e permitindo a obtenção de estruturas de elevada porosidade, não permitem o controlo da geometria e distribuição espacial de poros. Deste modo, não é possível através da utilização destas técnicas a produção de estruturas 3D de elevada porosidade com poros totalmente interconectados. A existência de um número muito significativo de poros fechado faz com que as estruturas sejam eficazes como filmes, permitindo a proliferação celular num ambiente 2D, não sendo adequadas a obtenção de tecidos 3D. Para além destas limitações estas técnicas envolvem em regra a utilização de solventes orgânicos tóxicos, elevados tempos de produção e baixa reprodutibilidade.

### 2.4.2 Tecnologias não-convencionais

Nos últimos anos, a produção de *scaffolds* com elevada precisão geométrica tem sido efectuada com recurso a tecnologias de fabricação automática. [68, 172]. A classificação destas tecnologias tem sofrido diversas alterações ao longo do tempo. Inicialmente foram classificadas como tecnologias de Prototipagem Rápida (RP, do inglês *Rapid Prototyping*), e mais recentemente, de acordo com os *standards* da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) passaram a ser classificadas como tecnologias de Fabricação Aditiva (AM). Apesar de ainda se encontrarem num estado muito inicial de desenvolvimento e aplicação, as técnicas de AM têm tido um impacto muito significativo nos domínios da biofabricação e ET apresentando um enorme potencial de desenvolvimento futuro. Na Figura 2.5 é apresentada de forma esquemática a evolução cronológica das técnicas de AM desde a sua invenção até ao actual estado da arte em termos de produção de estruturas para ET. Adicionalmente, encontram-se também assinalados alguns dos principais avanços científicos e tecnológicos.

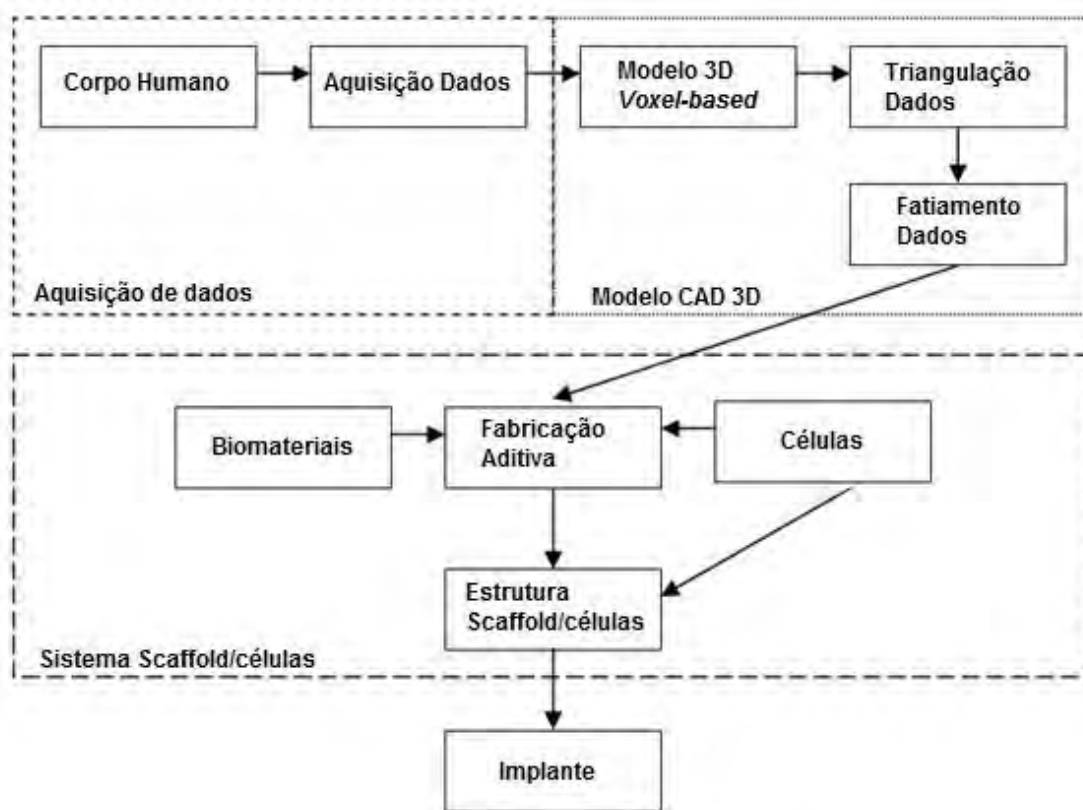


**Figura 2.5:** Revisão cronológica das técnicas de AM e das suas aplicações em ET.

Introdução de novas tecnologias e principais avanços científicos [226].

De acordo com o indicado na Figura 2.5, é possível verificar-se que a aplicação de técnicas de AM para reprodução física de objectos 3D efectuada directamente a partir de modelos computacionais emergiu na década de 1980. O conceito base das tecnologias de AM assenta na reprodução física de objectos 3D, camada a camada, a partir de dados bidimensionais (2D) obtidos através do fatiamento (*slice*) de modelos 3D criados em sistemas de CAD/CAM (CAM, do inglês *Computer Aided Manufacturing*) [227]. Na Figura 2.6 encontram-se ilustrados, de uma forma geral, as principais etapas associadas à criação de *scaffolds* para ET através de técnicas de AM.

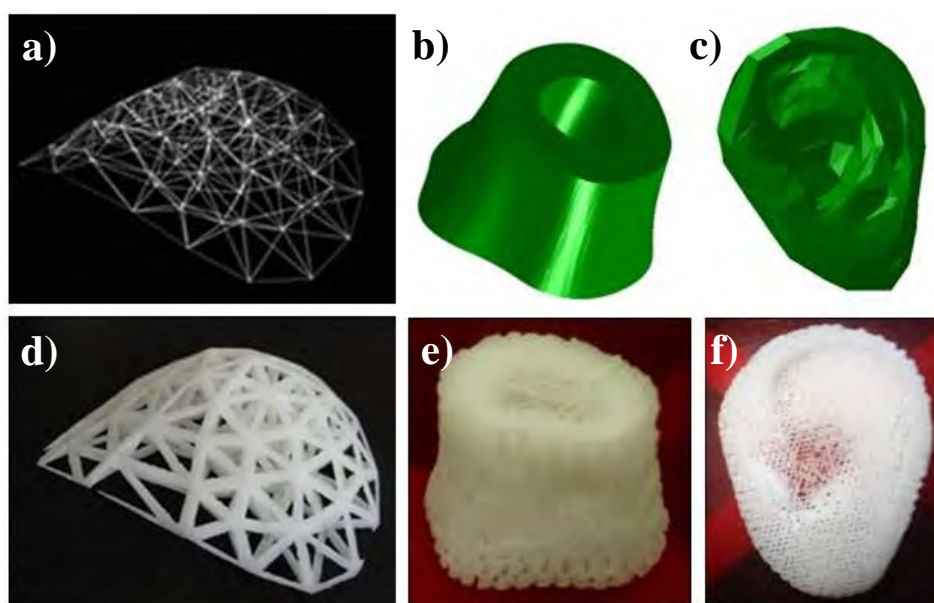
A primeira etapa envolve a geração do modelo sólido 3D a produzir. Este modelo pode ser obtido directamente através de softwares CAD 3D, importado a partir de scanners 3D ou a partir de dados obtidos por imagiologia médica (tomografia, ressonância magnética nuclear, ultra-sons, etc.) [228].



**Figura 2.6:** Representação esquemática dos passos necessários para produção de *scaffolds* para ET através do uso de técnicas de AM [228-233].

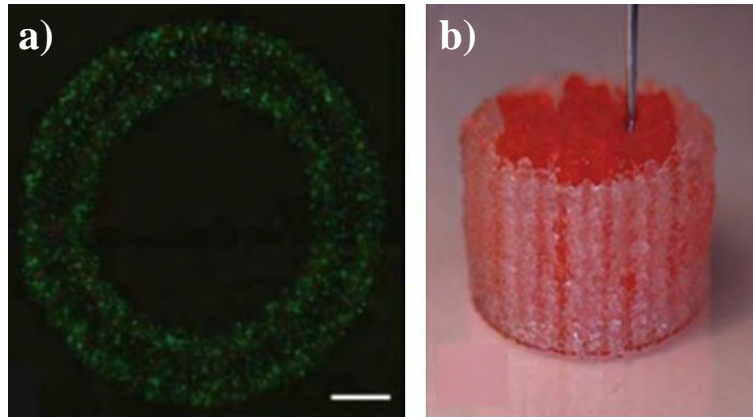
O modelo CAD é em seguida convertido num modelo STL que consiste na aproximação das superfícies do objecto por uma rede de elementos triangulares. Finalmente o modelo STL é fatiado matematicamente em finas camadas de espessura homogénea (ficheiro SLI) e enviado para uma das máquinas de AM a fim de ser produzido.

As principais vantagens das tecnologias de AM são a capacidade de produzir com relativa rapidez modelos 3D com geometrias altamente complexas utilizando diferentes tipos de materiais. Combinando estas tecnologias com técnicas de imagiologia é possível produzir estruturas personalizadas com geometria interna e externa adequada de modo a permitir um bom acoplamento biomecânico entre o implante e o tecido nativo no local de implantação. Na Figura 2.7 apresentam-se alguns exemplos de implantes personalizados produzidos através de tecnologias de AM.



**Figura 2.7:** Modelos CAD 3D e modelos físicos de implantes personalizados produzidos por extrusão. a) modelo CAD de implante mamário; b) modelo CAD do úmero humano; c) modelo CAD de uma orelha; d) modelo físico implante mamário; e) modelo físico do úmero humano; f) modelo físico de uma orelha.

Alguns processos podem operar à temperatura ambiente envolvendo esforços mecânicos pouco significativos e deste modo permitir a incorporação de células ou biomoléculas sem alterações significativas da viabilidade celular (Figura 2.8).



**Figura 2.8:** Exemplos de estruturas com células encapsuladas. a) hidrogéis à base de polietilenoglicol dimetacrilato com células encapsuladas preparado por SLA. b) estrutura de gelatina/alginate/fibrinogénio contendo células estaminais adiposas (rosa) e hepatócitos encapsulados em estruturas de gelatina/alginate/quitosano (branco) produzidos por bioimpressão [234-235].

No campo da ET, as tecnologias de AM têm sido utilizadas para produzir *scaffolds* com geometria externa customizada e morfologia interna pré-definida, permitindo um elevado controlo da dimensão, geometria e distribuição espacial dos poros [161].

As tecnologias de AM permitem a produção directa ou indirecta de *scaffolds*. Esta última metodologia requer a utilização de um molde perdido no qual é depositado o material que irá dar origem ao *scaffold* (Figura 2.9).

Os principais processos de fabricação aditiva para ET actualmente disponíveis ou em fase de desenvolvimento compreendem:

- Processos estereolitográficos;
- Processos de sinterização;
- Extrusão;
- *Inkjet Printing*;



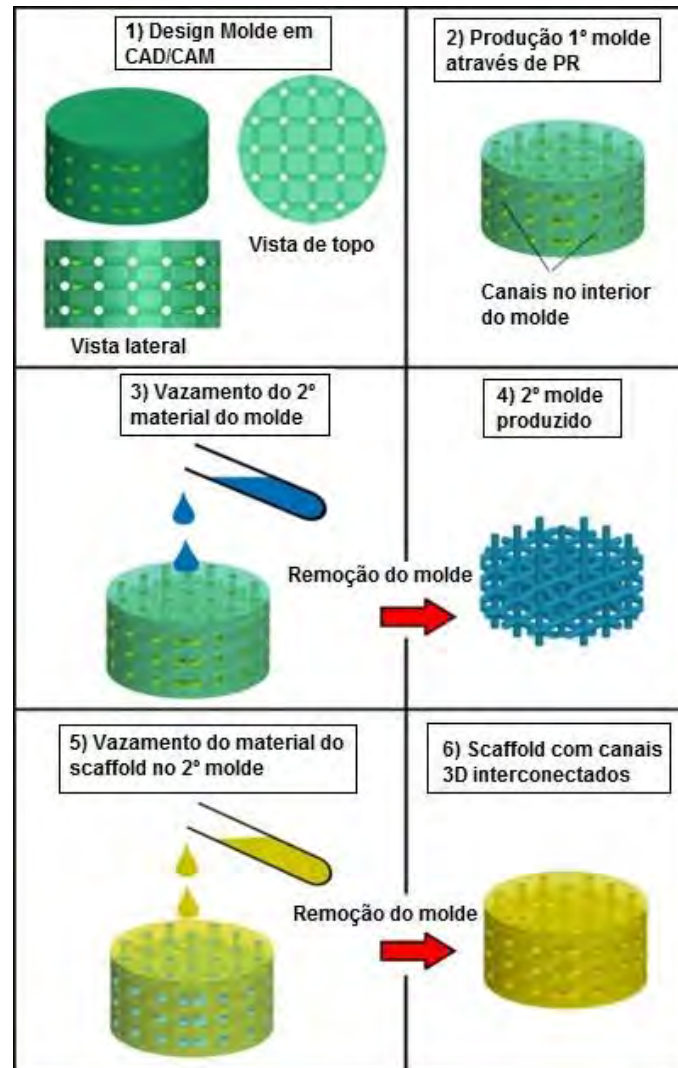


Figura 2.9: Metodologia para fabricação indirecta de *scaffolds* [236].

### **Processos estereolitográficos**

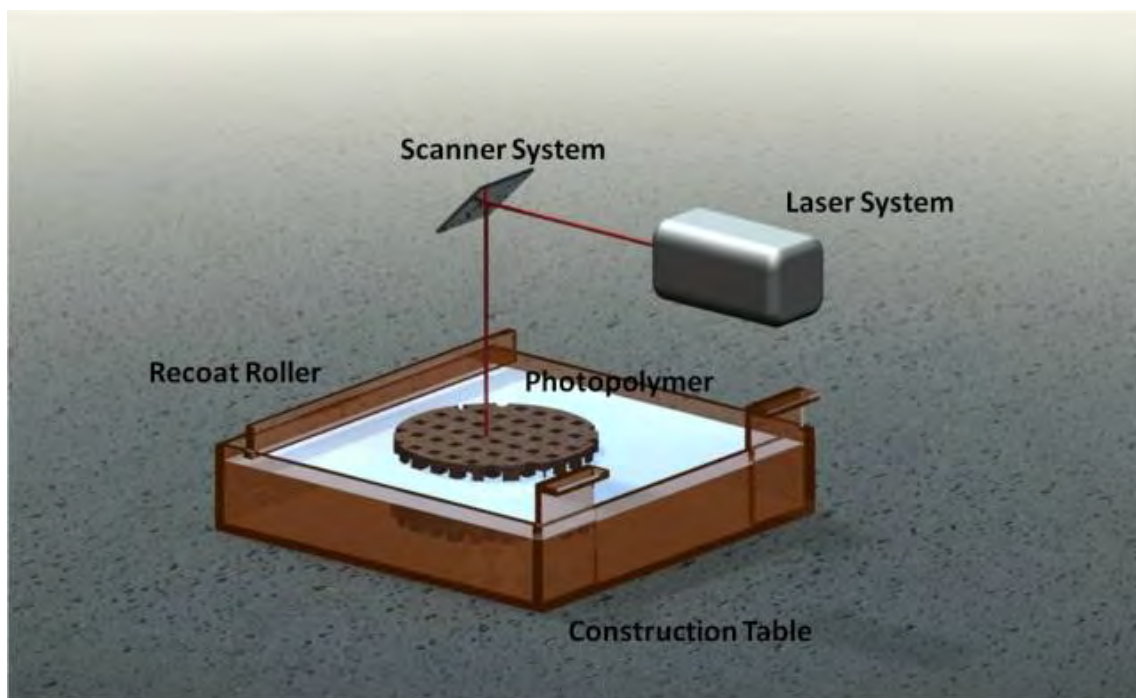
Os processos estereolitográficos de fabricação aditiva envolvem a solidificação selectiva de resinas fotossensíveis, tendo sido inicialmente propostos por Hull [81] e Pomerantz [237]. Actualmente os processos estereolitográficos compreendem dois métodos distintos de irradiação:

- Irradiação por máscara;
- Irradiação directa;



No primeiro método, cada camada de polímero é solidificado através da exposição a radiação ultravioleta (UV) gerada por uma lâmpada e transmitida através de uma máscara com áreas transparentes correspondentes à secção do modelo a fabricar. Esta estratégia é igualmente designada por método integrante de fabricação uma vez que cada camada é produzida de uma só vez [238]. No segundo método, também designado foto-fabricação vectorizada, é utilizado um laser para efectuar a polimerização ponto a ponto em cada camada do polímero definindo assim cada secção transversal do objecto 3D.

O sistema de irradiação directa é constituído por uma tina contendo um polímero fotossensível, uma plataforma móvel onde o modelo é construído, um laser irradiando radiação UV e um sistema óptico dinâmico para direccionar o laser ao longo da camada polimérica (Figura 2.10). Após a construção de cada camada, a plataforma desce no interior da tina contendo o polímero promovendo a formação de um filme polimérico não reticulado onde será construída a camada seguinte.



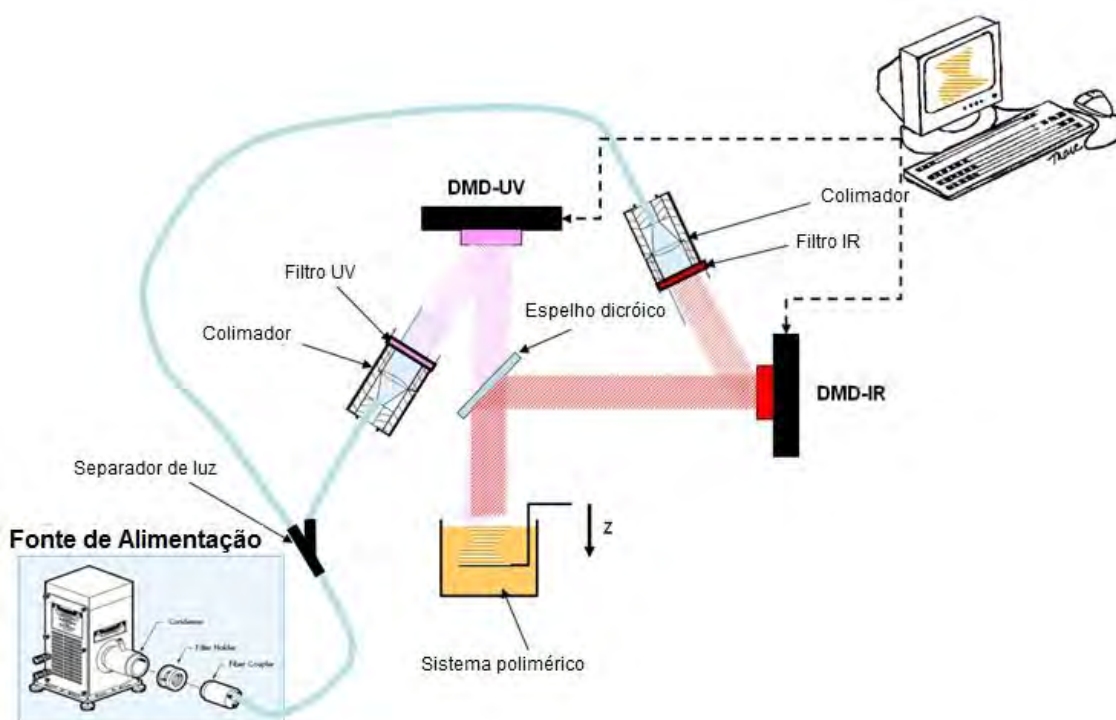
**Figura 2.10:** Representação esquemática do processo de estereolitografia [226].

Os métodos anteriormente mencionados envolvem mecanismos de polimerização (solidificação ou cura de resinas líquidas) através da absorção de um fóton de radiação. Contudo, existem processos baseados na utilização de lasers Femtosegundo emitindo radiação infravermelha (IR, do inglês *Infrared Radiation*), em que o sistema polimérico solidifica através de uma reacção desencadeada pela absorção de dois fótons de radiação. Este processo designado por polimerização bifotónica permite que o processo de cura ocorra não à superfície mas no interior do sistema polimérico possibilitando a obtenção de resoluções submicrométricas.

Com o objectivo de produzir estruturas multimaterial com gradientes funcionais, investigadores do Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto do Instituto Politécnico de Leiria (CDRSP, Portugal) estão a desenvolver, no âmbito de um projecto de investigação financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia de Portugal (PTDC/EME-PME/098037/2008) um novo sistema estereolitográfico denominado estereo-termo-litografia multimaterial (processo STLG) [239]. Este processo utiliza radiação UV e energia térmica (produzida por radiação IR) para iniciar a reacção de polimerização num meio contendo foto e termo iniciadores podendo operar nos seguintes modos (Figura 2.11):

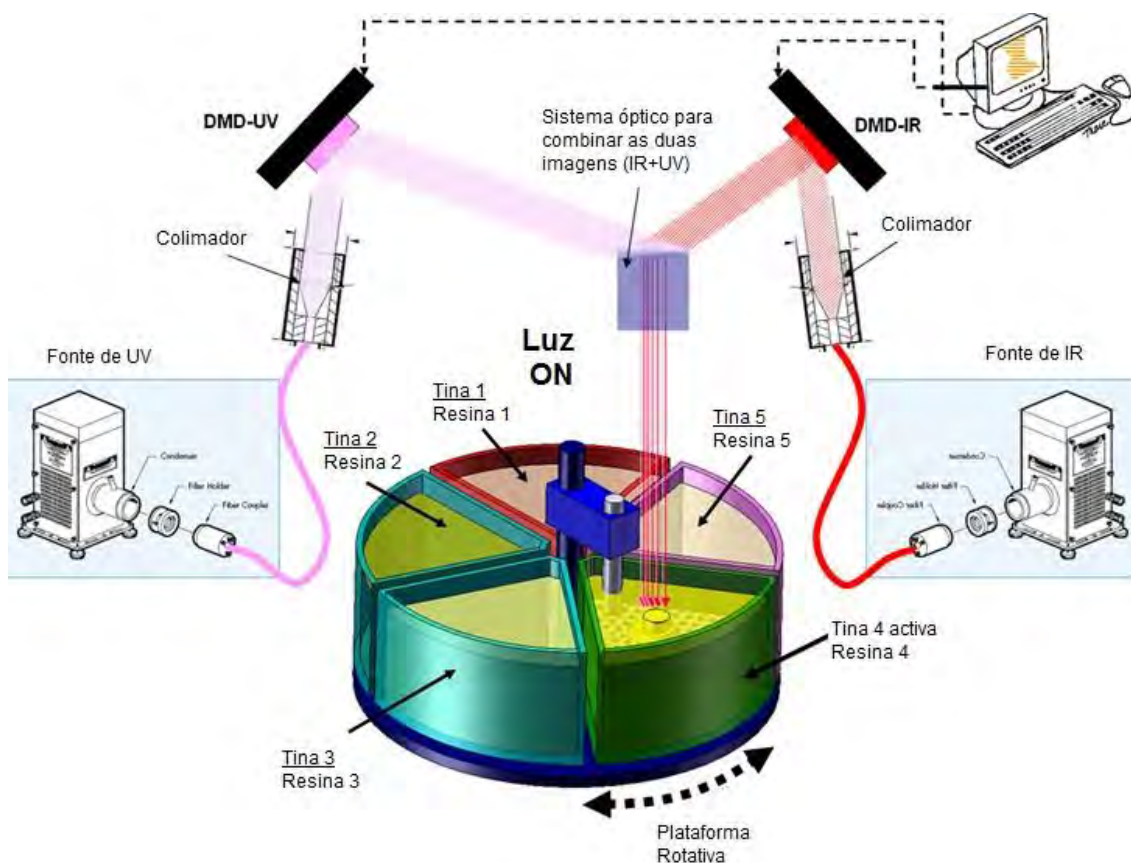
- Utilização de radiação UV para polimerizar sistemas poliméricos contendo foto-iniciadores;
- Utilização de radiação UV para polimerizar sistemas poliméricos contendo foto iniciadores e radiação IR para, por aumento de temperatura, aumentar a cinética de polimerização tornando o processo de fotofabricação mais rápido e a percentagem de material curado maior (evitando-se assim operações de pós-cura);
- Utilização de radiação IR para polimerizar sistemas poliméricos contendo termo-iniciadores. A utilização de sílica permite neste caso garantir a localização das zonas de polimerização e, consequência da minimização de efeitos de dispersão de radiação quando comparados com os observados com a radiação UV, a utilização deste modo de operação no processamento de sistemas poliméricos altamente reforçados com cargas cerâmicas ou metálicas [240].

- Utilização de radiação UV e IR para polimerizar sistemas poliméricos contendo foto e termo iniciador. A concentração de ambos os iniciadores deve ser baixa e a reacção só ocorre nas zonas de intersecção das duas radiações. Neste caso a temperatura é utilizada para, simultaneamente, produzir radicais através da fragmentação de termo iniciadores e aumentar a iniciação e taxa de reacção do processo de cura foto iniciado. Consequência das baixas concentrações de iniciadores este modo de operação permite o processamento de camadas de elevada espessura [227]



**Figura 2.11:** Representação esquemática do sistema STLG.

Adicionalmente, o sistema de STLG possui um dispositivo de construção rotativo com diversas tintas de modo a permitir a produção de estruturas multimaterial (Figura 2.12). Tal, representa um avanço muito significativo no campo da estereolitografia. Este sistema está a ser desenvolvido para produção de protótipos de engenharia multimaterial à escala micro, *scaffolds* com gradientes funcionais para ET, outros componentes biomédicos e componentes cerâmicos ou metálicos.



**Figura 2.12:** Representação esquemática do processo de STL: sistema multi-material [226].

O sistema STLG representa um importante desenvolvimento face a um outro sistema de estereolitografia integrante para a produção de micro dispositivos desenvolvido pelo CDRSP. Este sistema (Figura 2.13) compreende uma fonte de luz que consiste numa lâmpada de mercúrio de 200 Watts apresentando três picos fundamentais de radiação (320-390 nm com intensidade de radiação de 17 Watts/cm<sup>2</sup>, 390-450 nm com intensidade de radiação de 20 Watts/cm<sup>2</sup> e 280-320 nm com intensidade de radiação de 7 Watts/cm<sup>2</sup>), um *shutter* para o on/off da radiação, um conjunto de filtros e lentes colimadoras que garantem a selecção adequada do comprimento de onda, um DMD (*Digital Micro-Mirror Device* DMD 0.7 XGA 12° DDR, 1024x768 pixel de 14 µm de dimensão, ver Figura 2.14) de radiação UV cuja função é definir a micro imagem de cada secção transversal do micro objecto a construir, uma lente Zeiss para redução da imagem correspondente a cada secção transversal a construir (redução máxima 10X) e área de construção constituída por uma plataforma móvel contendo o reservatório de resina.

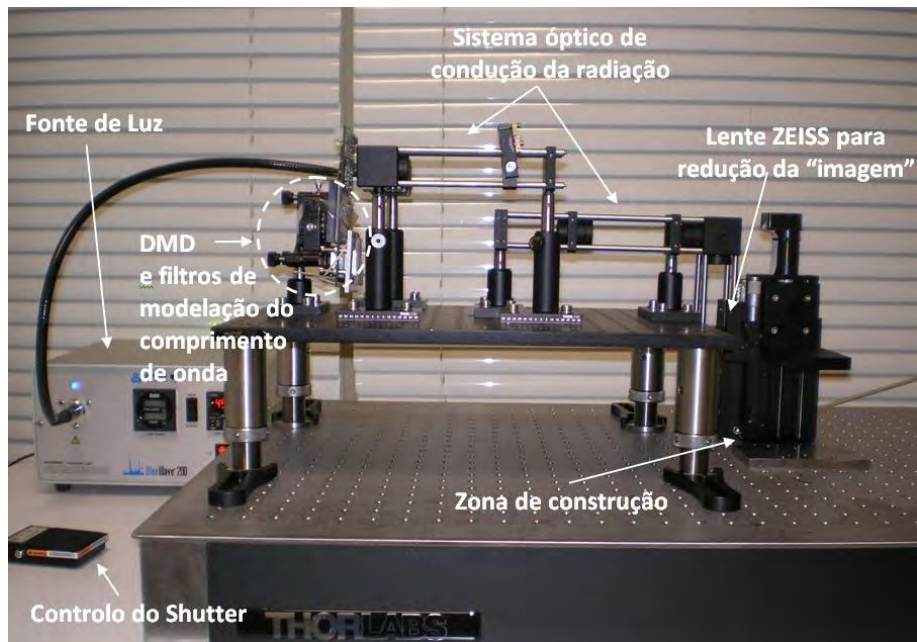


Figura 2.13: Sistema de micro-estereolitografia integrante desenvolvido no CDRSP.

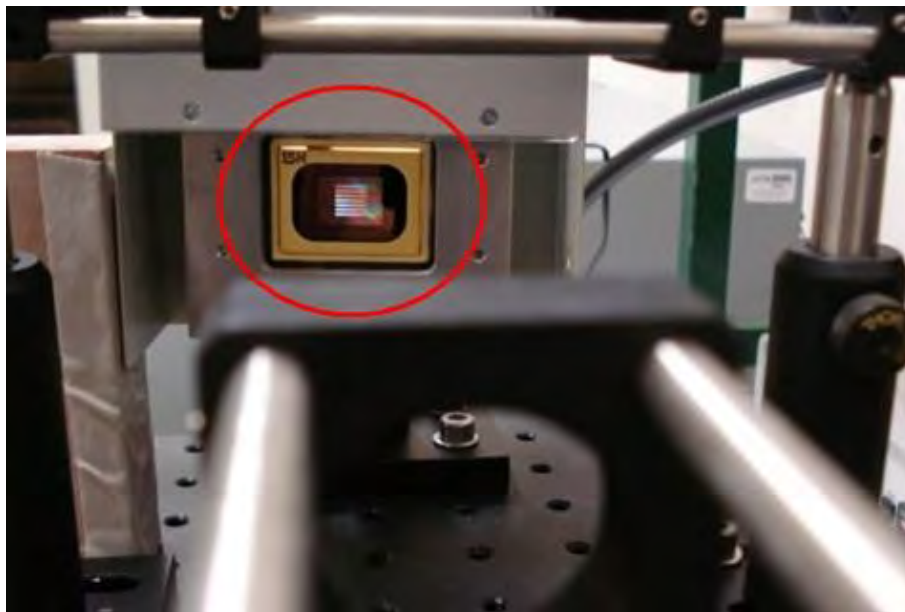


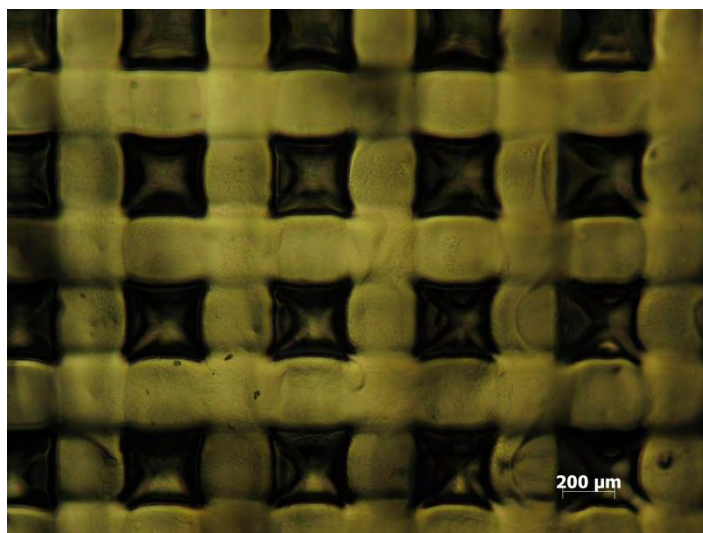
Figura 2.14: Sistema *Digital Mirror Device* (DMD).

A alimentação do reservatório é feita por uma bomba peristáltica a partir de um reservatório adicional. A plataforma de construção foi fabricada em alumínio e possui quatro suportes para o correcto nivelamento. A deslocação vertical da plataforma é



garantida por um posicionador uniaxial MICOS Translation Stage VT-80. Este posicionador permite incrementos verticais de 1  $\mu\text{m}$  a uma velocidade que varia entre 0.001 e 20 mm/s.

Este sistema permite o processamento de hidrogéis, redes poliméricas altamente reticuladas e bastante hidrofílicas armazenando grande quantidade água, para aplicações em ET (Figura 2.15). As estruturas são formadas pela reticulação física ou covalente de uma solução polimérica líquida transformando-a num sólido hidrogel. Uma grande gama de materiais podem ser utilizados para produzir tais estruturas nomeadamente a Agarose, o Dextrano, o Polietilenoglicol (PEG), o álcool polivinílico (PVA), o poli (hidroxietilmetacrilato) (pHEMA), etc. Neste caso os foto iniciadores utilizados devem possuir baixa citotoxicidade, possibilitando a polimerização de suspensões poliméricas contendo células.

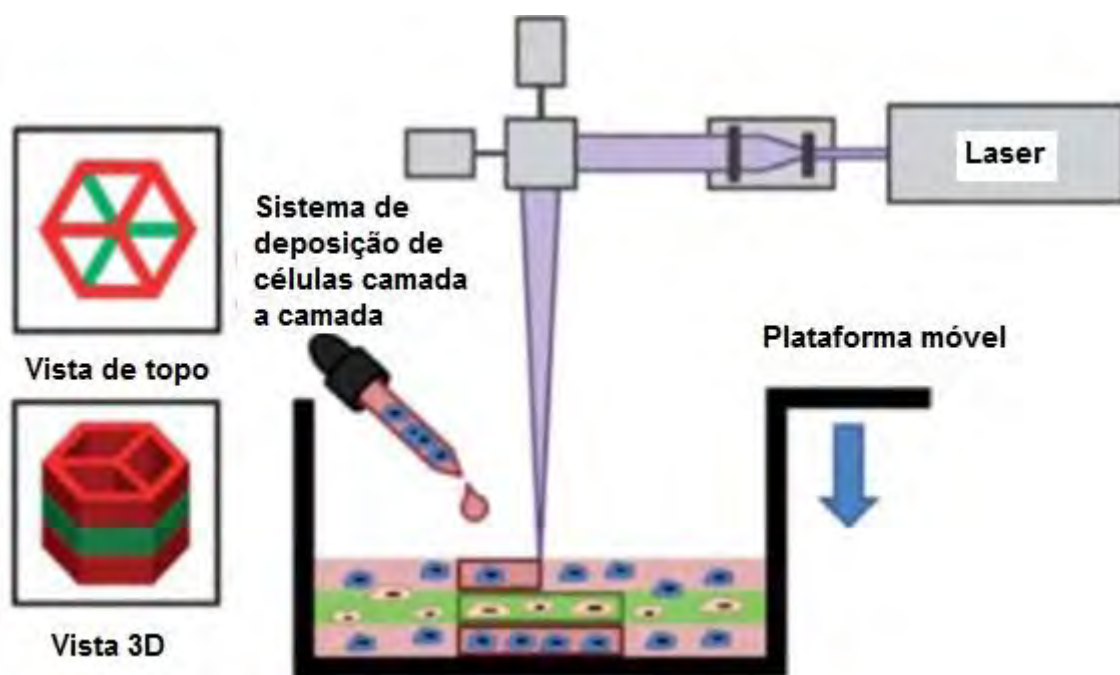


**Figura 2.15:** Matriz polimérica à base de pHEMA produzida através do sistema de estereolitografia integrante desenvolvido no CDRSP.

Para o encapsulamento de células, Chan [241] propôs uma modificação ao sistema de estereolitografia convencional (Figura 2.16). Neste caso a tina não possui o volume de solução polimérica contendo células necessário à construção dos *scaffolds*, sendo que o material é adicionado sequencialmente à medida que cada camada vai sendo

polimerizada evitando-se assim que as células se depositem no fundo da tina por efeito de gravidade.

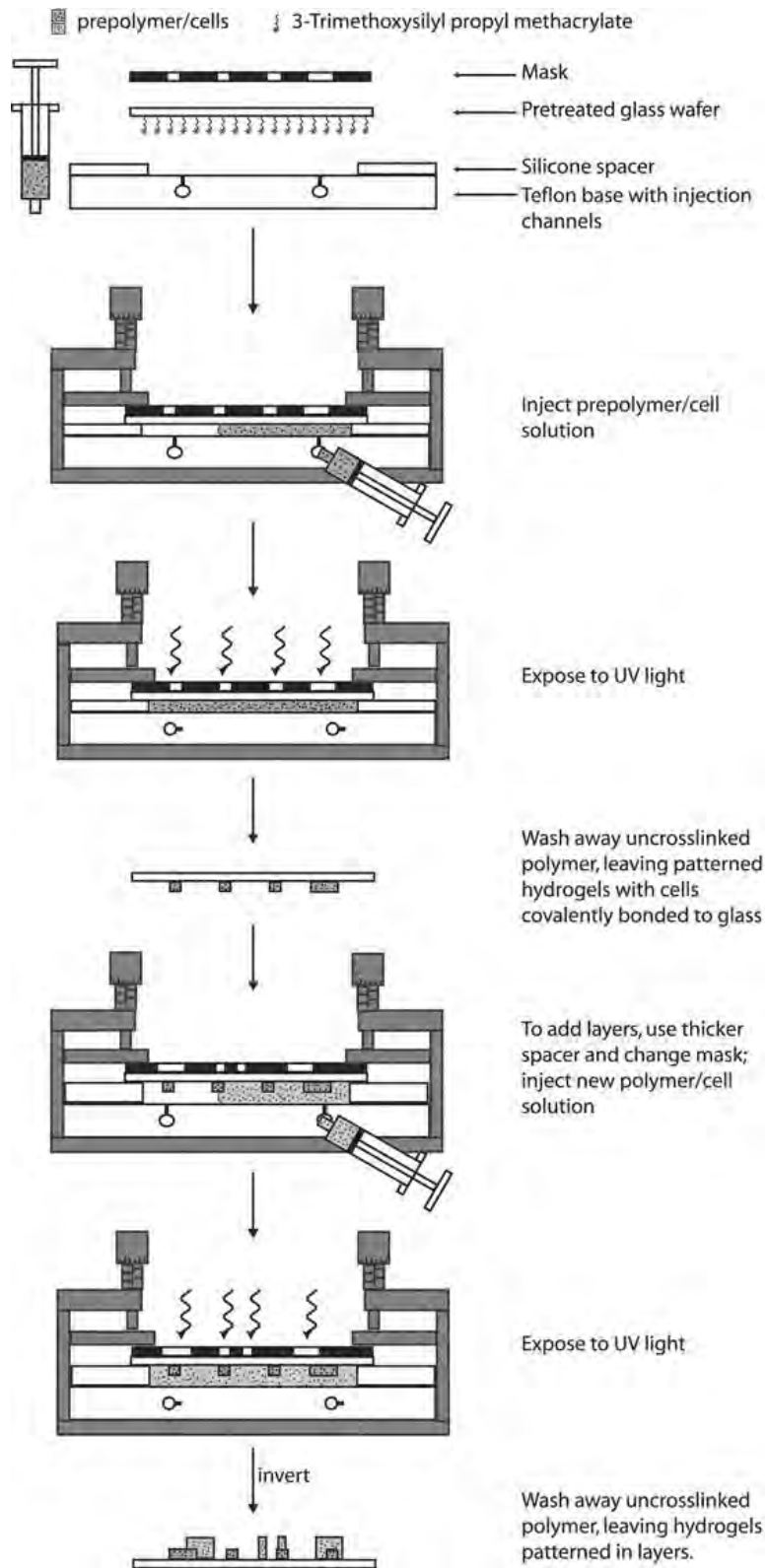
Para além de se obter uma distribuição celular homogénea, esta metodologia permite também a utilização de diferentes tipos de materiais e linhas celulares. Neste caso particular, a deposição do material e das células é feito manualmente, no entanto o processo pode facilmente ser alterado e automatizado.



**Figura 2.16:** Representação esquemática do processo de estereolitografia modificado, no qual a solução contendo polímero e células é depositado manualmente na tina, camada a camada, de baixo para cima [241].

De forma semelhante Liu e Bhatia desenvolveram um método de irradiação por máscara para a produção de estruturas encapsulando células com resolução micrométrica. Neste processo a solução polimérica contendo células e depositada na área de trabalho através da utilização de uma seringa (Figura 2.17)

Capítulo 2 – Estado da Arte

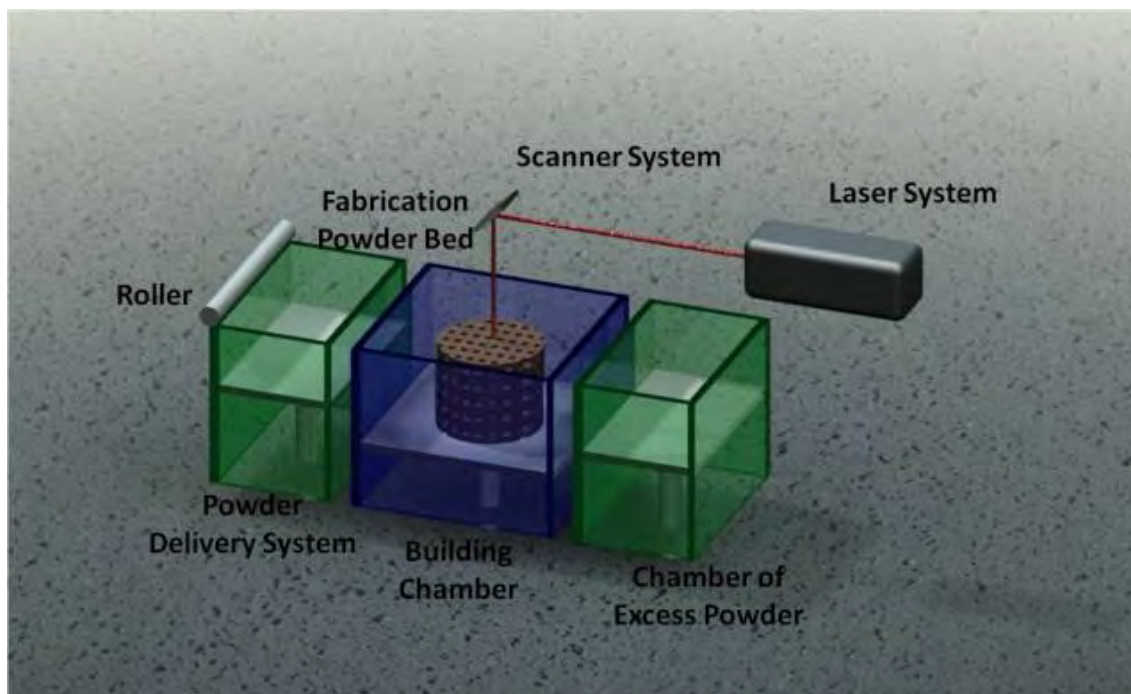


**Figura 2.17:** Processo para a formação de microestruturas de hidrogel contendo células [242].



### **Processos de sinterização**

O processo de sinterização selectiva por laser, inicialmente proposto por Deckard [243] (SLS) permite a construção camada a camada de modelos físicos 3D a partir da utilização de materiais em pó. O material é processado num ambiente inerte e termicamente controlado, no interior de uma câmara de processamento, atingindo uma temperatura próxima do ponto de fusão através da utilização de um laser capaz de emitir radiação IR. O laser varre cada uma das camadas de pó de acordo com os dados CAD do modelo, sinterizando selectivamente o material. A energia fornecida pelo laser serve não só para promover a fusão entre as partículas adjacentes da mesma camada, mas também para permitir a adesão da nova camada à anterior. Após a formação de cada camada, a plataforma desce uma determinada distância (de acordo com a espessura da camada), sendo depositado um novo estrato de material (por intermédio de um rolo) e o processo de produção recomeça. O material não sinterizado serve de suporte à camada seguinte evitando igualmente possíveis deslocamentos do protótipo (Figura 2.18)



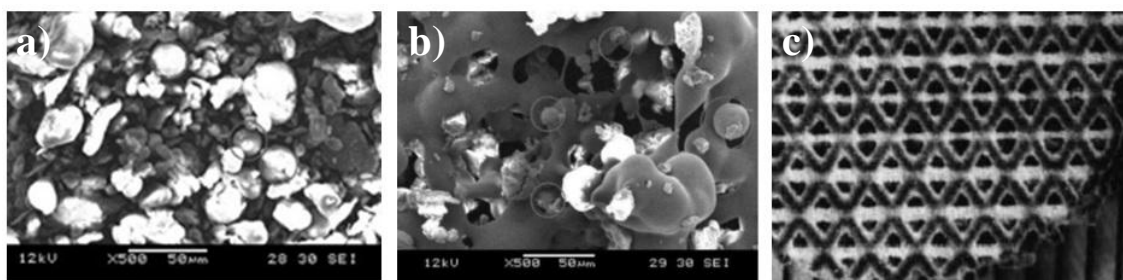
**Figura 2.18:** Representação esquemática do processo SLS [226].

Actualmente, os processos de sinterização laser compreendem dois métodos de produção:

- Sinterização directa
- Sinterização indirecta

Os processos de sinterização indirecta envolvem lasers de menor potência para o processamento de pós metálicos cerâmicos e eventualmente poliméricos revestidos com um polímero de baixo ponto de fusão. O resultado é a formação de uma estrutura compósita com material polimérico a servir de ligante. Os objectos, uma vez produzidos, são em seguida submetidos a operações de remoção de ligante e sinterização e finalmente de infiltração para se garantir a alta densidade. Os processos de sinterização directa envolvem lasers de alta potência capazes de gerar altas densidades energéticas localizadas e permitindo assim o processamento directo de pós metálicos ou cerâmicos. As estruturas obtidas apresentam elevadas densidades próximas dos 98%.

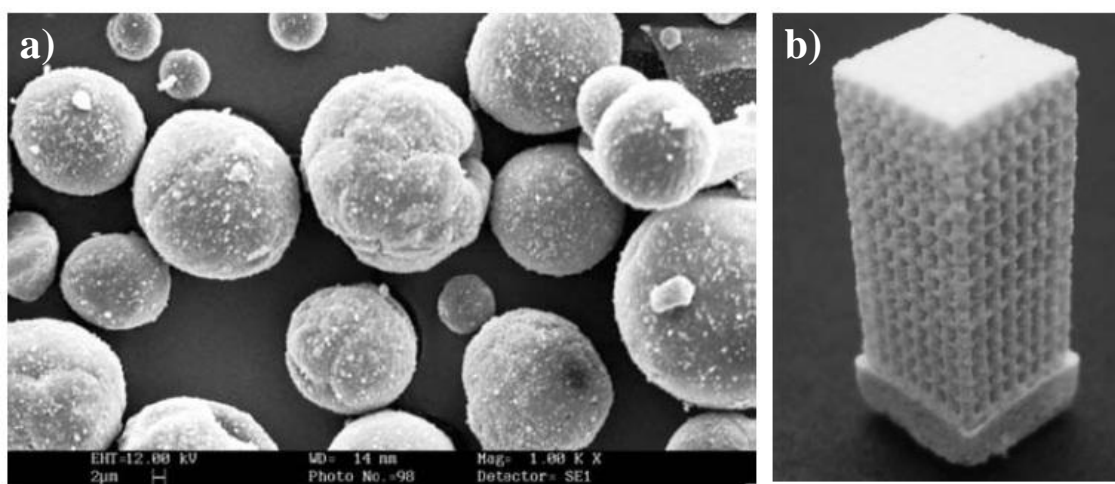
Em ET, estes processo têm sido utilizados para a produção de *scaffolds* em PCL, PLLA (ácido poli-L-láctico), PEEK (poli-éter-éter cetona) e materiais cerâmicos.



**Figura 2.19:** Imagens SEM de material compósito á base de PEEK-10% wt HA (a) antes e (b) depois da sinterização. c) Vista inferior de *scaffold* compósito de PEEK-HA [244-245].

Williams [173], por exemplo, demonstrou o potencial do sistema de SLS na produção de *scaffolds* de PCL para regeneração óssea. As estruturas produzidas foram testadas biologicamente utilizando fibroblastos e factores de crescimento ósseo (BMP-7).

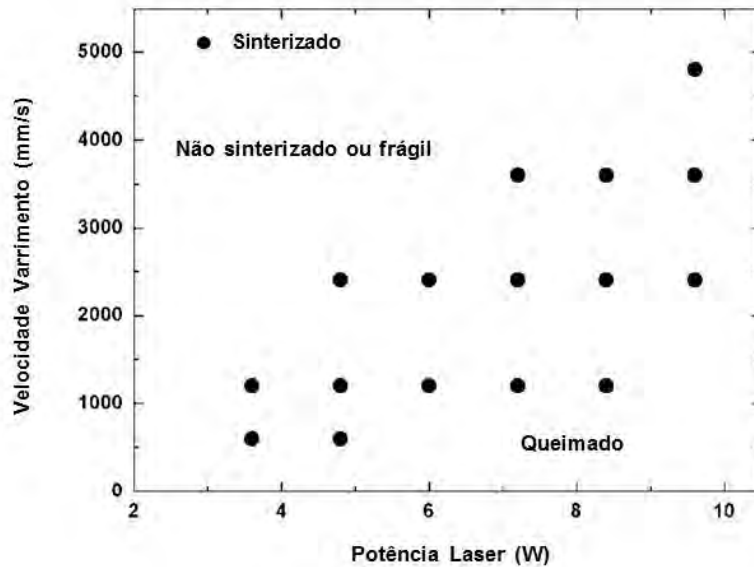
Resultados *in vivo* demonstraram que os *scaffolds* induziam o crescimento de novo tecido e que as suas propriedades mecânicas se situavam no limite mínimo da resistência do osso trabecular (módulo de compressão de 52-67 MPa e tensão de cedência de 2-3.2 MPa). Zhou [246] estudou a utilização de bio-nano-esferas compósitas para produção de *scaffolds*, utilizando igualmente um sistema SLS. Para tal utilizou uma matriz de PLLA onde introduziu nano-esferas de hidroxiapatita carbonatada (CHAp) (Figura 2.20). As microesferas de PLLA e os nano-compósitos de PLLA/CHAp foram produzidos por técnicas de emulsão. As microesferas obtidas apresentavam uma dimensão de 5-30  $\mu\text{m}$ . A utilização destas microesferas nano-compósitas apresenta um elevado potencial na resolução do problema relacionado com a remoção de material não sinterizado do interior dos poros após o final do processo produtivo.



**Figura 2.20:** a) Imagens SEM de microesferas nano-compósitas à base de PLLA/CHAp.  
b) *Scaffolds* nano-compósitos de PLLA/CHAp [246].

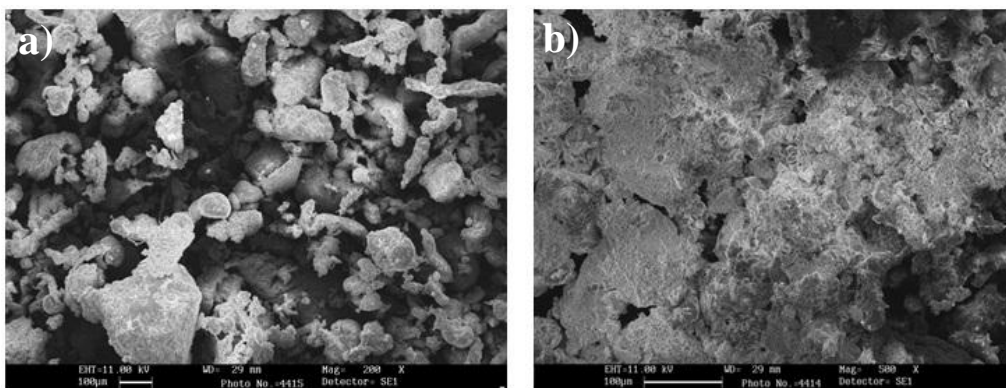
O estabelecimento de correlações entre as condições de processamento e as características dos *scaffolds* obtidos, visando a definição de janelas óptimas de processamento tem sido igualmente objecto de investigação. Hao [247] conduziu diversos estudos relacionados com o potencial de aplicação de SLS na produção de *scaffolds* de polietileno de alta densidade (HDPE, do inglês *High Density Polyethylene*)

reforçado com HA. Para tal foram consideradas diversas velocidades de varrimento bem como diferentes potências do laser (Figura 2.21).



**Figure 2.21:** Janela de processamento de compósitos de HA/HDPE através de SLS [247].

As misturas de HA e HDPE (40% em massa de HA) foram preparadas utilizando uma misturadora de alta velocidade. Os resultados morfológicos permitiram correlacionar a variação da morfologia com os parâmetros de processo utilizados (Figura 2.22). Os resultados obtidos permitiram verificar que para baixas potências do laser ou elevadas velocidades de varrimento, as camadas produzidas apresentavam propriedades mecânicas muito frágeis ou então não se encontravam sinterizadas.

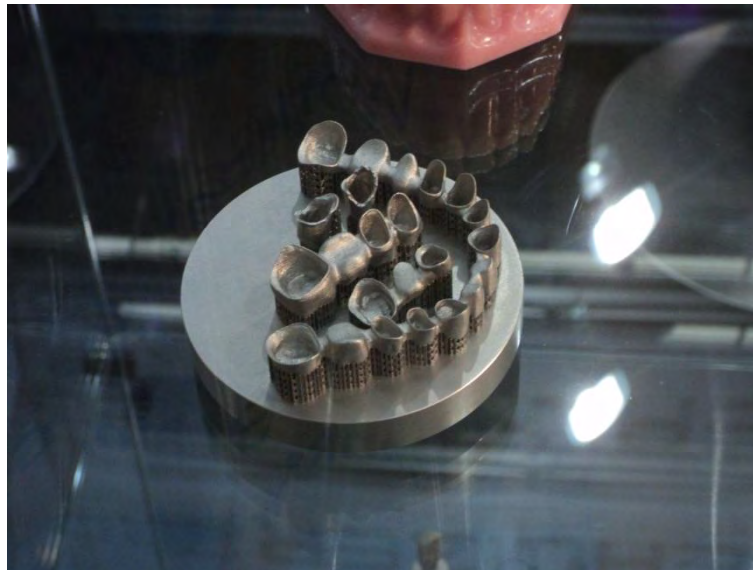


**Figure 2.22:** Imagens SEM da superfície das camadas sinterizadas utilizando uma velocidade de varrimento constante de 1200 mm/s e diferentes potências de laser: a) 3.6W; b) 7.2W [247].

Apesar da importância da sinterização selectiva por laser como processo aditivo de biofabricação para a produção de *scaffolds* biodegradáveis, a utilização destas técnicas tem incidido mais na produção de implantes metálicos permanentes com ou sem porosidade. A este nível destacam-se os trabalhos de Kruth [248] e Leu [249] sobre a utilização de sinterização metálica (processo de sinterização directa) para a produção de molduras dentárias em titânio ou os trabalhos de Burell sobre a utilização de sinterização selectiva para a produção de estruturas porosas em titânio e ligas metálicas com memória de forma (Nitinol) destinadas a aplicações ósseas [250]. Variantes do processo de sinterização selectiva têm vindo igualmente a ser propostas destacando-se o processo LENS (LENS, do inglês *Laser Engineering Net Shaping*) desenvolvido pelos laboratórios Sandia (EUA) e o processo de Fusão Selectiva por Feixe de Electrões (processo EBM, do inglês *Electron Beam Melting*). Estes processos, incluindo o SLS, têm sido utilizados para a produção de implantes permanentes numa gama alargada de materiais incluindo titânio, ligas de cobalto, aço inoxidável e ligas metálicas com memória de forma (Figura 2.23 e Figura 2.24).

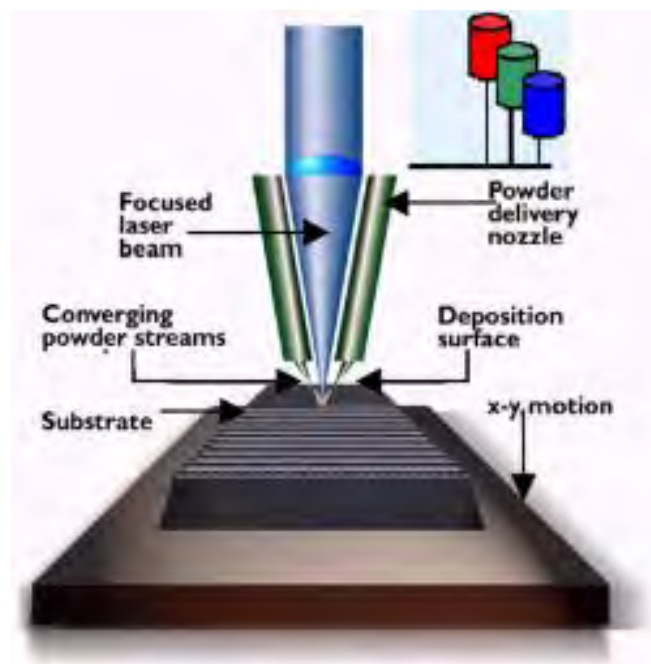


**Figura 2.23:** Prótese femoral em titânio produzido através de EBM.



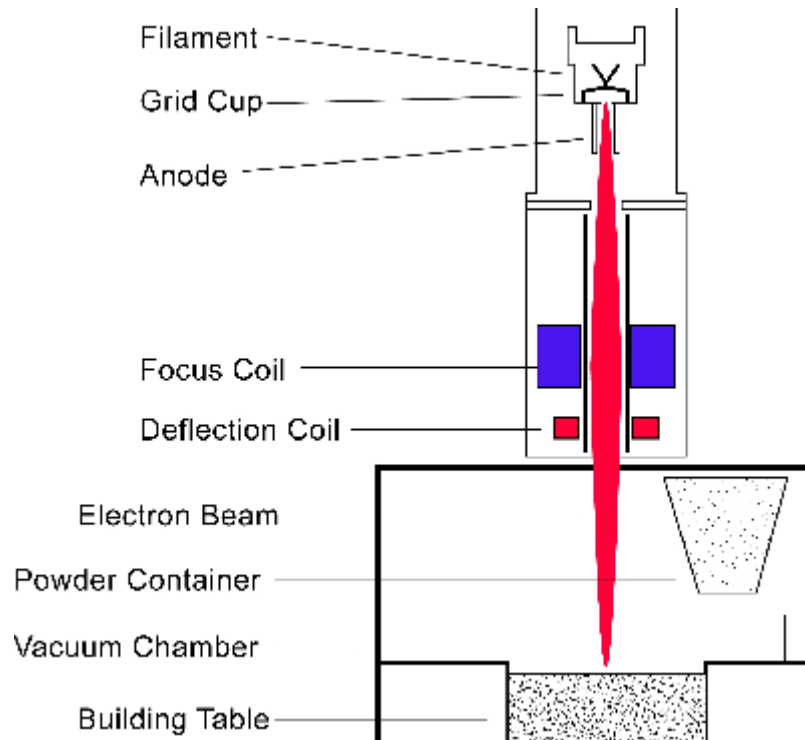
**Figura 2.24:** Moldura dentária em titânio produzida por SLS.

O processo LENS utiliza um laser estado sólido Nd:YAG para fundir material metálico depositado sobre um substrato. O material é injectado sob a zona de construção através de quatro dispositivos de fornecimento de material coaxiais ao laser. Tal como no processo de sinterização selectiva por laser, o material é igualmente processado num ambiente inerte.



**Figure 2.25:** Representação esquemática do processo LENS [251].

O processo EBM desenvolvido pela empresa Arcam (Suécia) utiliza um feixe de electrões para selectivamente fundir material metálico. Este processo permite a definição de pontos de irradiação de menor dimensão que os obtidos por sinterização selectiva por laser, sendo ainda caracterizado por elevadas velocidades de varrimento e elevada interacção feixe-material.



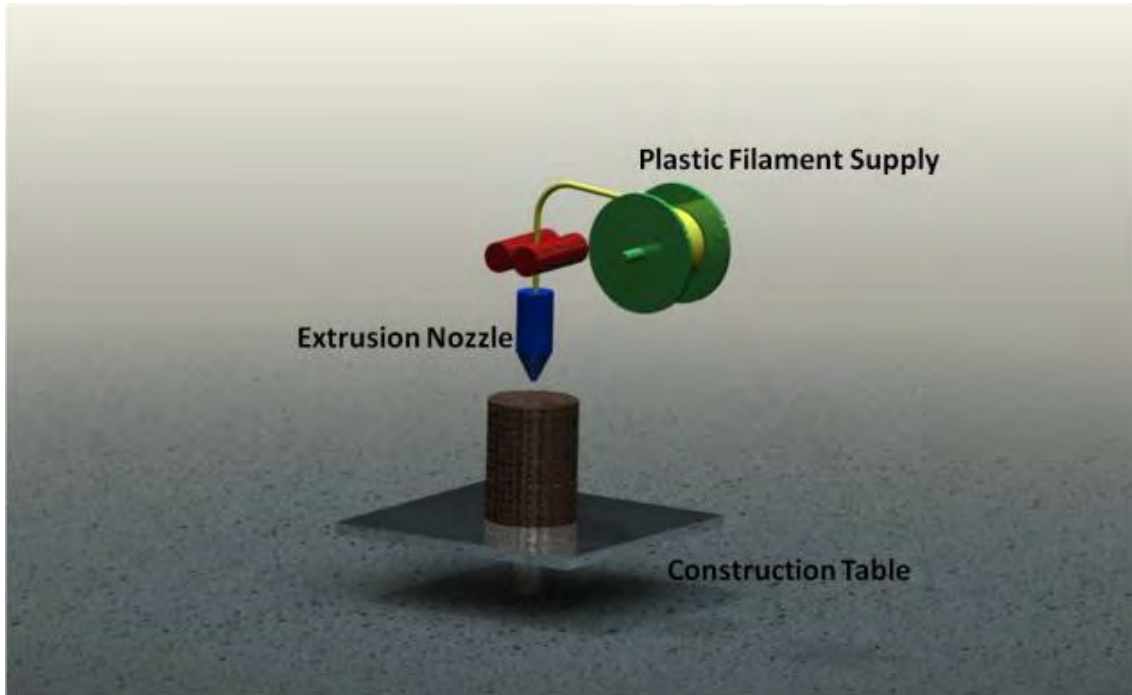
**Figura 2.26:** Representação esquemática do processo EBM [252].

### **Extrusão**

O processo de extrusão foi inicialmente proposto por Crump sob a designação de *Fused Deposition Modeling* (FDM) [253]. Através deste processo, filamentos de material termoplástico são fundidos e depositados, camada a camada, por intermédio de uma cabeça de extrusão controlada computacionalmente, de modo a formar o objecto 3D desejado (Figura 2.27). A cabeça de extrusão é alimentada com recurso a uma bobine que contém material na forma de fio. O material fundido é depositado numa plataforma de construção onde arrefece rapidamente passando ao estado sólido. É importante referir que a camada construída deve ser mantida a uma



temperatura ligeiramente abaixo da temperatura de solidificação do material de modo a promover a correcta deposição da camada seguinte bem como a permitir uma boa adesão inter-camadas.



**Figura 2.27:** Representação esquemática do processo de FDM [226].

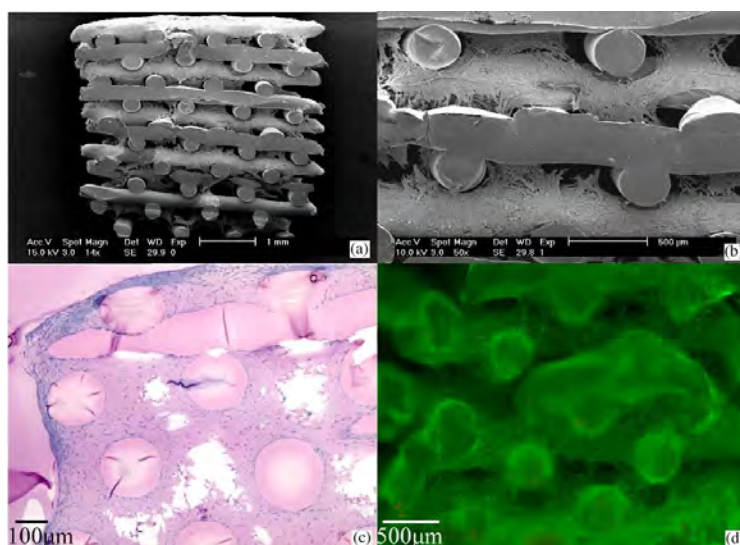
O processo FDM utiliza para a construção de modelos duas estratégias de varrimento: *raster*, *contour* e combinação *raster/contour*. No processo de fabricação a primeira camada é geralmente definida reproduzindo-se em primeiro lugar o contorno da secção transversal e em seguida a área interna. Para aumentar a resistência da peça a direcção do preenchimento *raster* é alternada de 90º a cada nova camada. Inicialmente desenvolvido para o processamento de materiais termoplásticos o processo de FDM foi recentemente estendido à produção de componentes funcionais numa variedade de materiais cerâmicos. Este processo, designado de FDC (FDC, do inglês *Fused Deposition of Ceramics*), compreende as seguintes etapas:



- Preparação das misturas;
- Extrusão;
- Eliminação de ligante;
- Infiltração;

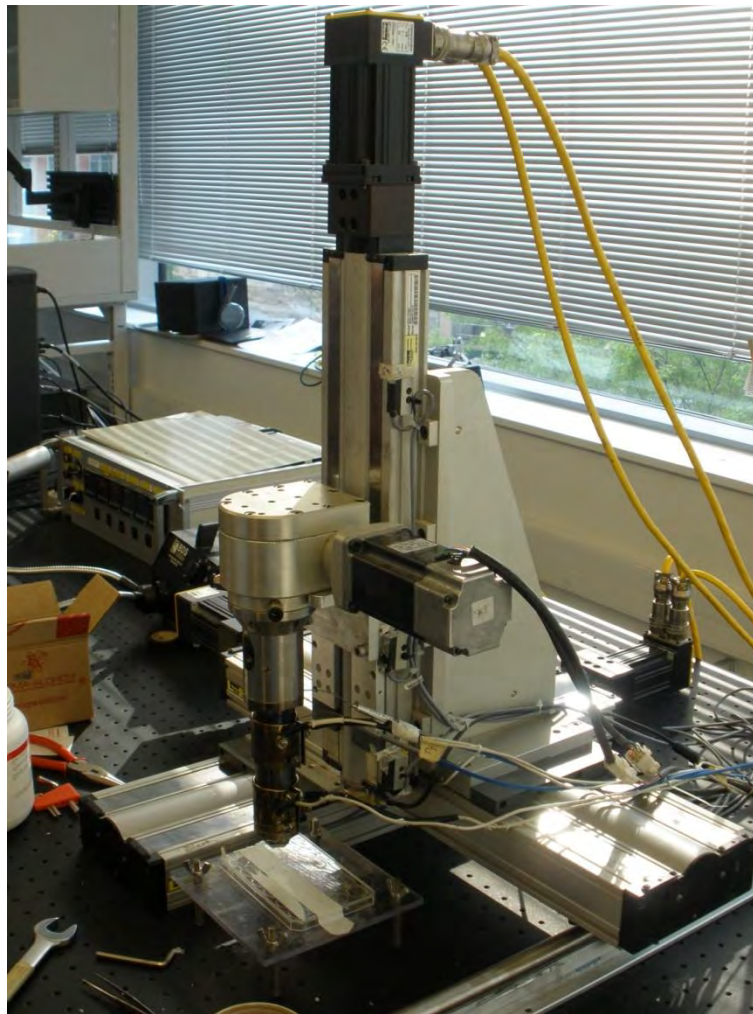
Um dos principais problemas associados ao processo FDM reside na necessidade de produção de pré-filamentos bem como na necessidade de se usarem elevadas temperaturas para o processamento dos materiais. De modo a ultrapassarem-se estas desvantagens têm vindo a ser propostas alternativas ao processo de FDM.

Woodfield [87] utilizou um sistema baseado no processo de FDM, denominado por *3D Fibre Deposition* para produzir *scaffolds* à base de um co-polímero de poli(etileno glicol)-tereftalato-poli(butileno tereftalato) (PEGT/PBT) para regeneração da cartilagem articular. Os resultados obtidos permitiram verificar que através da variação da composição do co-polímero, porosidade e geometria de poros, é possível produzir *scaffolds* com propriedades mecânicas similares às da cartilagem nativa. Adicionalmente as análises biológicas *in vitro* permitiram observar uma distribuição homogénea dos condrócitos depositados nas estruturas poliméricas bem como uma subsequente formação de tecido neo-cartilaginoso.



**Figura 2.28:** Images de SEM (a e b), coloração com safranina-O (c) e teste *live/dead* obtidas a partir de *scaffolds* em PEGT/PBT cultivados *in vitro* com condrócitos [87].

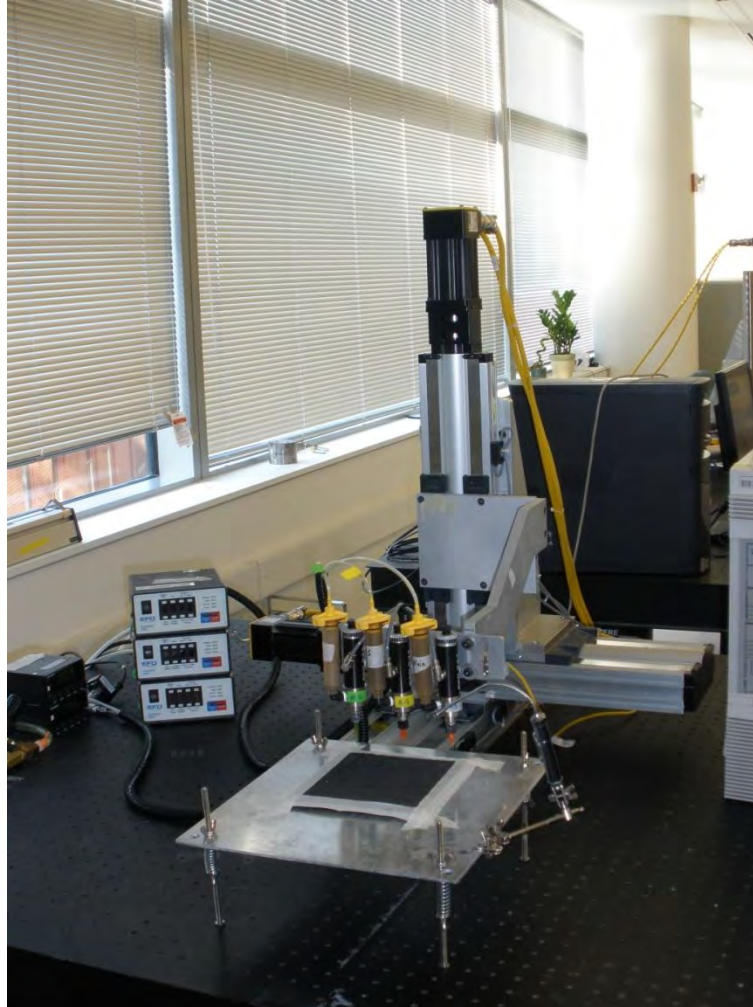
A Universidade de Drexel (EUA) desenvolveu um novo conceito de extrusão baseado na tecnologia de FDM, designado por *Precision Extruding Deposition* (PED), para produção de *scaffolds* para regeneração óssea (Figura 2.29). O material, na forma de *pellet* ou grão, é inicialmente colocado numa câmara onde é fundido. Posteriormente, através do uso de um fuso controlado por um motor eléctrico, o material é forçado a passar através um *nozzle* e a ser depositado numa plataforma de construção.



**Figura 2.29:** Sistema PED desenvolvido pela Universidade de Drexel (EUA).

Este equipamento tem sido utilizado para a produção de *scaffolds* poliméricos com geometrias e dimensões variadas [255]. Testes biológicos têm sido efectuados com recurso a diferentes linhas celulares nomeadamente cardiomioblastos, fibroblastos e células musculares.

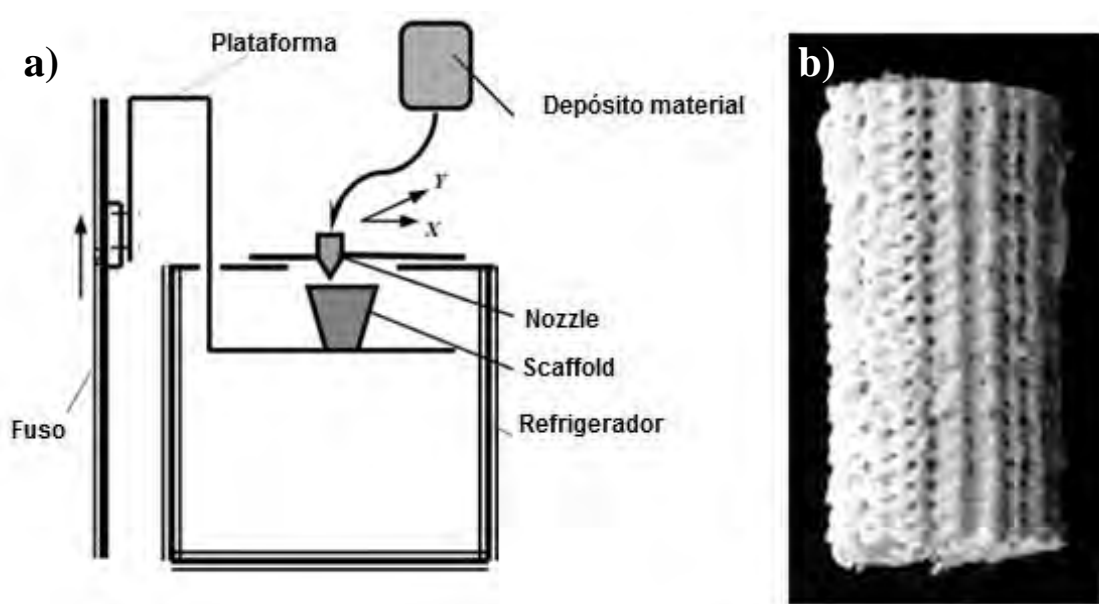
O mesmo grupo desenvolveu um outro sistema designado por *Multi-Nozzle Deposition* destinado à produção de *scaffolds* em hidrogel (Figura 2.30). Este sistema opera à temperatura ambiente e a baixas pressões permitindo a deposição de materiais de baixa viscosidade com células encapsuladas [256].



**Figura 2.30:** Sistema *Multi-Nozzle Deposition* desenvolvido pela Universidade de Drexel (EUA).

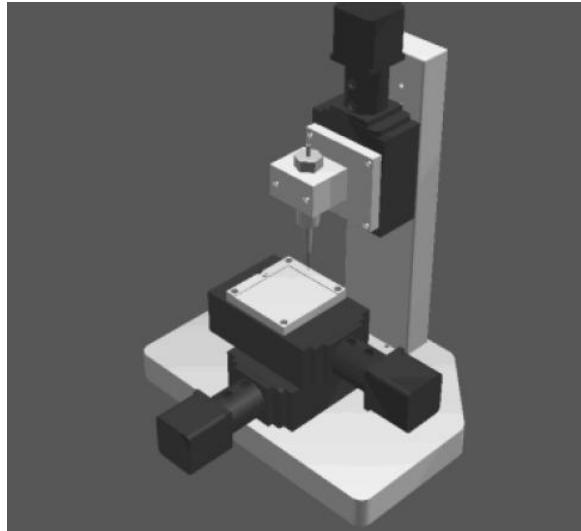
De forma a eliminar a necessidade de se usarem elevadas temperaturas durante a fase de processamento, investigadores da Universidade de Tsinghua (China) desenvolveram um processo de extrusão denominado por *Low-temperature Deposition Manufacturing* (LDM) capaz de produzir *scaffolds* a uma temperatura de 0°C [257]. A tecnologia de LDM compreende múltiplas cabeças de extrusão e um processo de separação de fase para a construção de *scaffolds* para ET (Figura 2.31). O sistema foi utilizado para

produzir *scaffolds* compósitos de PLLA-TCP com incorporação de factores de crescimento BMP. As estruturas foram implantadas *in vivo* em coelhos e cães com defeitos a nível do rádio. Após 12 semanas de implantação *in vivo* foi possível observar uma completa reparação do defeito nos coelhos bem como a formação de novo tecido ósseo com propriedades similares às do tecido nativo envolvente. No caso dos cães os mesmos resultados foram observados após 24 semanas [257].



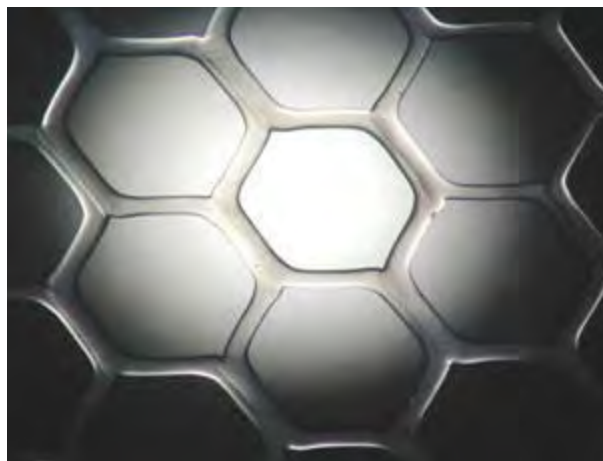
**Figura 2.31:** a) Representação esquemática do sistema LDM. b) Exemplo de *scaffolds* compósitos de PLLA/TCP produzidos por LDM [258].

Vozzi [259] desenvolveu um sistema designado por *Pressure Assisted Microsyringe* (PAM), para a produção de estruturas 2D com resolução inferior a  $10\ \mu\text{m}$  (Figura 2.32).



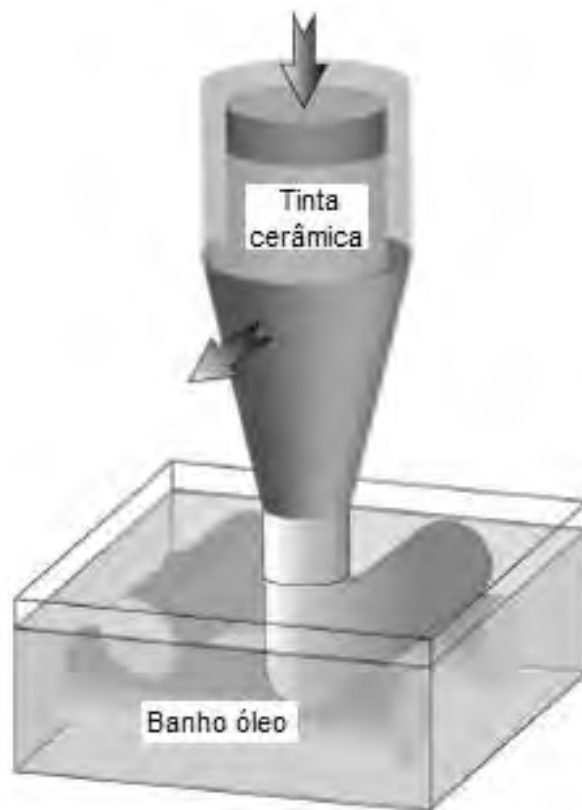
**Figura 2.32:** Sistema *Pressure Assisted Microsyringe* [260].

Este processo envolve a deposição de uma solução polimérica através de uma seringa. A dimensão dos filamentos extrudidos pode ser controlada através da variação da pressão da seringa, viscosidade da solução, diâmetro da agulha da seringa e velocidade do motor. Os autores reportaram a produção de estruturas 2D com uma resolução inferior a 10  $\mu\text{m}$  (Figura 2.33).



**Figura 2.33:** Estruturas 2D em PCL/PLA obtidas através do sistema PAM [261].

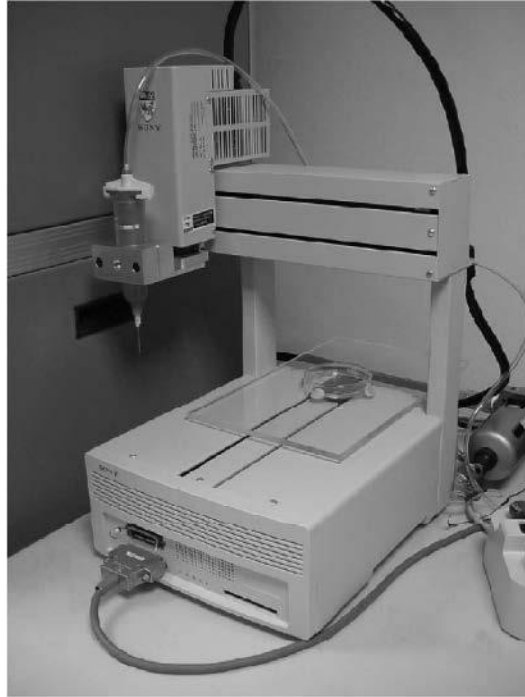
Para o processamento de *scaffolds* cerâmicos e biovidro o laboratório Sandia (EUA) desenvolveu um processo designado por *Robocasting* (Figura 2.34) [262-263]. Este processo consiste na extrusão de pastas cerâmicas ou na deposição de suspensões coloidais altamente carregadas com cargas cerâmicas, capazes de suportar o seu próprio peso durante o processo produtivo devido às suas propriedades viscoelásticas [264]. As estruturas obtidas são em seguida sujeitas a um processo de sinterização para a obtenção dos *scaffolds* cerâmicos finais.



**Figura 2.34:** Ilustração do processo *Robocasting* [262].

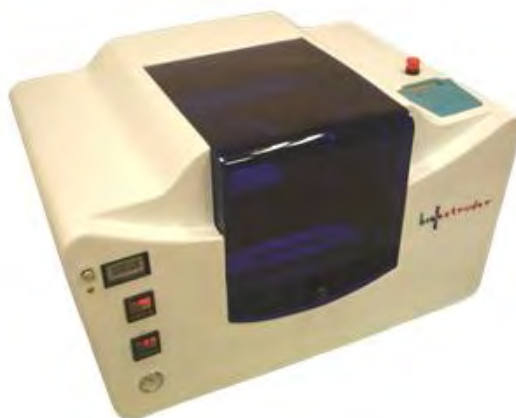
De forma semelhante investigadores da Universidade Nacional de Singapura (NUS, Singapura), desenvolveram um sistema designado por *Robotic Dispensing System* para a produção de *scaffolds* em Quitosano/HA (Figura 2.35).





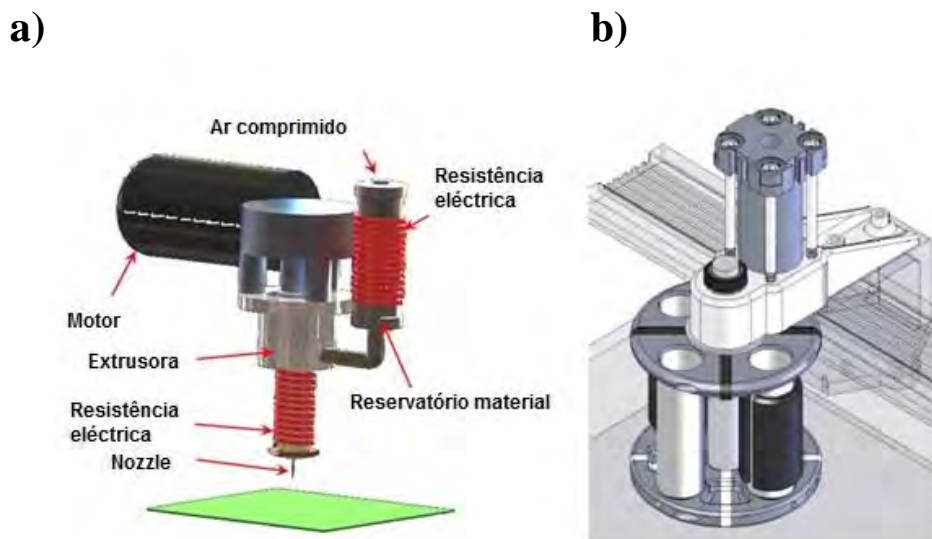
**Figura 2.35:** Sistema *Robotic Dispensing* [265].

O Instituto Politécnico de Leiria desenvolveu uma variante do processo de FDM designada por *BioExtruder* [266] (Figura 2.36). Este é um sistema de baixo custo e elevada reprodutibilidade que permite a produção de *scaffolds* com elevada precisão dimensional e geométrica dos poros. Deste modo é possível modular as propriedades mecânicas e aumentar a difusão molecular das estruturas.



**Figura 2.36:** Sistema *BioExtruder*.

O equipamento compreende dois sistemas distintos de deposição: um sistema de extrusão rotativo multimaterial accionado por um dispositivo pneumático e outro para produção de *scaffolds* mono-material baseado na utilização de um fuso (Figura 2.37). O sistema rotativo possui quatro reservatórios, dois com controlo de temperatura e outros dois sem controlo de temperatura. O diâmetro dos *nozzles* que podem ser utilizados é muito vasto e varia entre 0.1 mm e 1 mm. O código de deposição, desenvolvido em Matlab (The Math-Works, Inc.), é baseado na linguagem de programação ISO vulgarmente aplicada em máquinas de Controlo Numérico Computadorizado (CNC, do inglês *Computer Numerical Control*).



**Figura 2.37:** a) Sistema de extrusão mono-material; c) Sistema de extrusão multimaterial.

### ***Inkjet Printing***

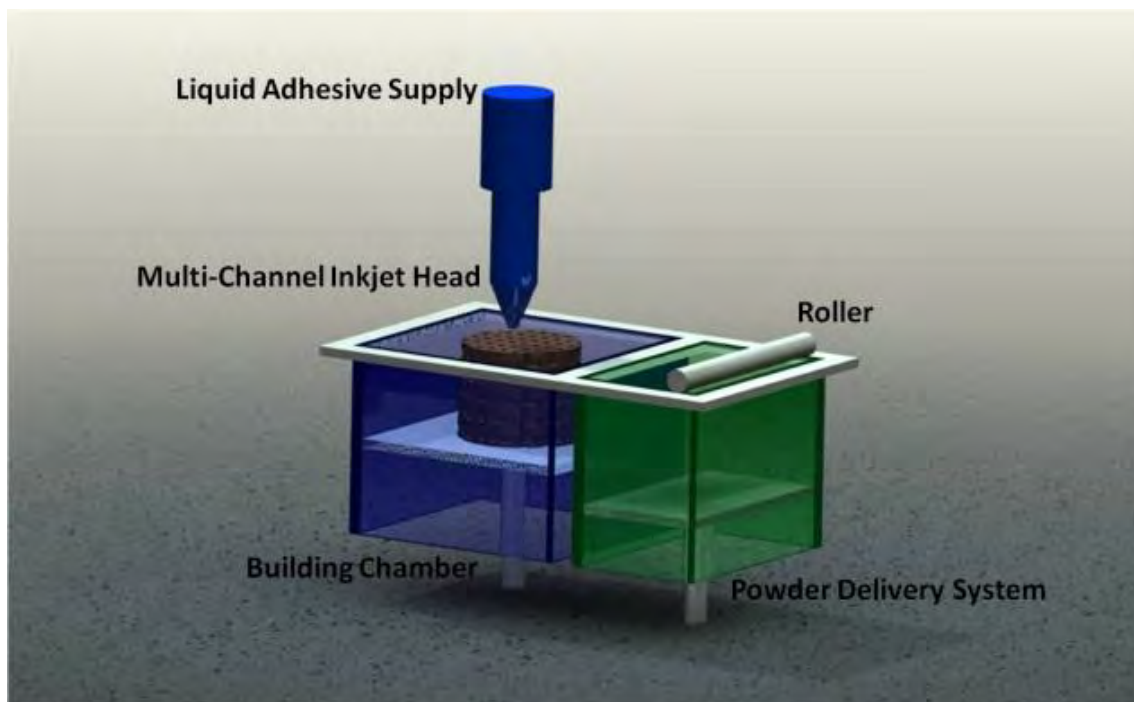
Os processos aditivos de impressão do tipo *InkJet Printing* compreendem duas estratégias distintas de construção [227]:

- Construção por deposição selectiva de ligante;
- Construção por deposição selectiva de material;



A primeira estratégia de fabricação e actualmente comercializada pela empresa Stratasys (EUA) utilizando tecnologia das impressoras a jacto de tinta. Este processo, designado por impressão 3D (3DP, do inglês *Three Dimensional Printing*) foi desenvolvido no Massachusetts Institute of Technology (MIT, EUA) por Sachs e Cima [267].

Este processo consiste na distribuição homogénea de uma camada de material em pó sobre a plataforma de trabalho seguida da deposição selectiva de um material aglutinante nas zonas a construir (Figura 2.38). Após a formação de cada camada, a plataforma de construção baixa uma determinada distância (accionada por um pistão), sendo depositada nova camada de material. Estas etapas são repetidas de forma sequencial até o objecto 3D estar construído. Para a produção de *scaffolds* cerâmicos é ainda necessário proceder-se a uma operação de sinterização.



**Figura 2.38:** Representação esquemática do processo de impressão 3D [226].

A empresa Therics (EUA) utiliza a tecnologia 3DP sob licença do MIT para a produção de estruturas para ET, nomeadamente *scaffolds* e dispositivos de entrega controlada de fármacos. Os *scaffolds* podem ser modulados através da variação da velocidade de

impressão, fluxo e deposição de material aglutinante. O sistema 3DP funciona à temperatura ambiente e pode ser aplicado a um largo espectro de biomateriais.

A estratégia de impressão por deposição selectiva de ligante tem sido utilizada para a produção de *scaffolds* numa gama alargada de polímeros (PLGA, PLLA/PCL, Amido e cerâmicos) testados biologicamente com diferentes linhas celulares (osteoblastos, fibroblastos, hepatócitos, etc.) [219, 268-270].

A estratégia de deposição selectiva de material compreende duas técnicas:

- Formação de um jacto contínuo (utilização de materiais de baixa viscosidade e frequências de impressão bastante elevadas);
- Deposição de partículas individuais (utilização de frequências de impressão mais lentas e materiais menos viscosos). Processo *Drop-on-demand*.

A estratégia de construção através da formação de um jacto contínuo de material é actualmente comercializada pela empresa 3D Systems (EUA) utilizando a tecnologia das impressoras a jacto de tinta. Neste processo vários jactos de ceras poliméricas previamente fundidas são utilizados para a produção rápida de modelos conceptuais. Esta estratégia é igualmente utilizada pela empresa 3D Systems e pela empresa Objet (Israel) para o processamento de materiais poliméricos de baixa viscosidade. Estes materiais são polimerizados por radiação através de um mecanismo semelhante ao descrito para os processos estereolitográficos.

Cui [271] utilizou um sistema de impressão térmica 3D modificado para demonstrar a possibilidade de produção de sistemas microvasculares através da impressão de soluções de células endoteliais suspensas em soluções de trombina directamente sobre soluções fibrinogénicas (substrato). As células impressas demonstraram a capacidade de interagir e proliferar no interior dos canais de fibrina formando estruturas tubulares. De forma semelhante Boland utilizou uma impressora jacto de tinta da HP modificada para a impressão de células encapsuladas em alginato e colagénio. Testes com células musculares e neuronais foram realizados com sucesso [272-274].

Um processo alternativo foi desenvolvido por Mironov *et al* [275] e por Yan *et al* [276] para a impressão directa de células. Este processo baseia-se na impressão de géis, células individuais ou agregados celulares e constitui uma possível solução para o desenvolvimento de estratégias sofisticadas de impressão de órgãos. Para a impressão de células as cabeças de impressão baseadas em princípios térmicos ou piezoelétricos devem ser modificadas e os “tinteiros” substituídos por géis poliméricos. Outra alternativa para a impressão de células consiste na utilização de um laser para auxiliar o processo de impressão. Esta técnica designada por BioLP (do inglês, *Biological Laser Printing*) foi utilizada na impressão directa de células progenitoras humanas e nanopartículas de HA [277]. Os processos de impressão de células baseiam-se, em regra, em estratégias *drop on demand* envolvendo a deposição de pequenos volumes de material sobre um substrato em hidrogel polimérico que funciona como suporte.

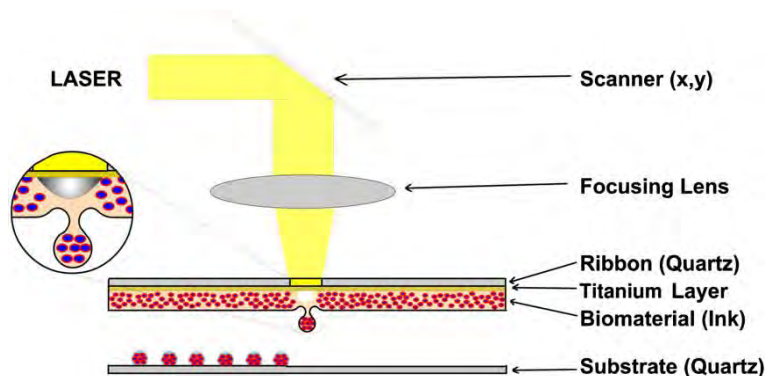


Figura 2.39: Representação esquemática do processo BioLP [277].

As taxas de degradação do material de suporte e do material depositado devem ser iguais as taxas de proliferação das células encapsuladas no material depositado.

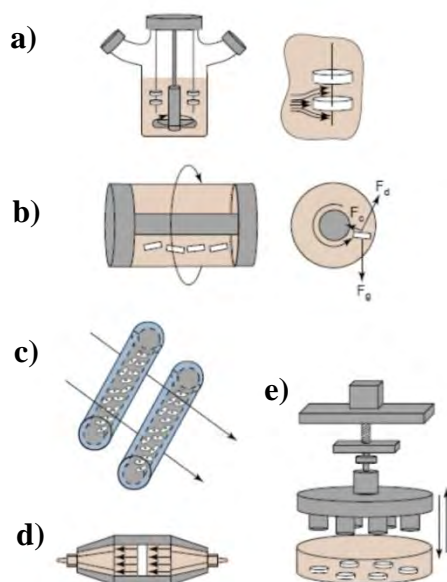
## 2.5 Bioreactores

A cultura celular estática é a técnica mais utilizada em ET. No entanto esta técnica é caracterizada por uma distribuição celular heterogénea. A maioria das células encontra-se confinada à superfície externa dos *scaffolds* resultando numa distribuição heterogénea *in vitro* da matriz extra celular. Os bioreactores têm vindo a ser desenvolvidos na tentativa de ultrapassar estas limitações. Para tal o seu design e concepção deve ter em conta os seguintes aspectos:

- Manutenção de uma distribuição homogénea de células no *scaffold* 3D;
- Fornecimento de níveis adequados de oxigénio, nutrientes e factores de crescimento;
- Exposição das células em cultura a estímulos mecânicos;

O termo bioreactor designa um sistema no qual as condições de cultura são controladas de forma precisa com o objectivo de promover ou induzir determinados comportamentos celulares. Actualmente existem diferentes tipos de bioreactores disponíveis, podendo ser agrupados em quatro tipos principais (Figura 2.40):

- Bioreactores tipo *Spinner flasks*;
- Bioreactores tipo rotativos;
- Bioreactores tipo *hollow-fiber*;
- Bioreactores tipo perfusão;



**Figura 2.40:** Representação esquemática de bioreactores para ET. a) *Spinner flask*; b) Rotativo; c) *Hollow-fiber*; d) Perfusão [278].

## 2.6 Sumário

A ET representa actualmente a área da ciência com maior potencial de aplicação ao nível da regeneração/reparação de tecidos ou órgãos danificados. O princípio básico da ET assenta na combinação de *scaffolds*, células e moléculas bioactivas com o objectivo de formar bioimplantes capazes de promover a regeneração de tecidos. O *scaffold* desempenha um papel crucial nesta metodologia representando o suporte inicial para adesão, proliferação e diferenciação celular. Adicionalmente existem diversos requisitos que devem ser considerados ao longo do seu processo de produção, nomeadamente propriedades físico-químicas, morfologia e cinética de degradação. A sua dimensão e geometria externa são de elevada importância, particularmente se houver a necessidade de customização para um determinado paciente. Para além das propriedades físico-químicas (resistência mecânica, química de superfície, cinética de degradação, etc.), a microarquitetura do *scaffold* é de extrema importância para o processo de formação de um novo tecido. Nos últimos anos, diversas técnicas e metodologias de produção, em particular sistemas automáticos de produção, têm vindo a ser aplicados na fabricação de *scaffolds* com elevada precisão geométrica e reprodutibilidade. Através da utilização e conjugação de tecnologias de fabricação aditiva, sistemas CAD e técnicas de imagiologia, é possível produzir *scaffolds* com arquitecturas bem definidas bem como implantes anatómicos e customizados. Ao longo deste capítulo apresentaram-se as técnicas aditivas utilizadas ou em desenvolvimento para aplicações em ET. Estas técnicas apresentam princípios de construção distintos e podem ser utilizadas para o processamento de materiais igualmente distintos. Em alguns casos é possível o encapsulamento de células enquanto noutros fruto das condições extremas de processamento tal não é possível. Cada uma das técnicas de fabricação aditiva apresentadas possui vantagens e desvantagens (Tabela 2.3) não existindo actualmente uma técnica que possa ser considerada como ideal. Contudo, o trabalho de revisão bibliográfico efectuado permite concluir que os sistemas cujo princípio se baseia na extrusão são aqueles que oferecem maior versatilidade quer em termos de condições de processamento quer em termos de materiais. O trabalho de revisão bibliográfica efectuada mostra igualmente que não existem no mercado sistemas totalmente integrados concebidos

para aplicações específicas em ET. Como consequência desta limitação os actuais sistemas de fabricação aditiva são utilizados para a produção de matrizes com ou sem células encapsuladas, sendo a cultura celular efectuada num dispositivo adicional (bioreactor). Isto faz com que os sistemas existentes não estejam devidamente adaptados à prática clínica. Esta é uma das limitações que se pretende resolver com o sistema proposto nesta dissertação e cuja descrição se apresenta no Capítulo 4.

**Tabela 2.3:** Vantagens e desvantagens das técnicas comerciais de AM.

<b>Tecnologia</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Estereolitografia (SLA)</b>	Elevada precisão dimensional; Geometrias complexas;	Materiais fotossensíveis; Necessidade de pós-cura; Utilização de lasers;
<b>Sinterização (SLS)</b>	Elevada resistência mecânica; Elevada porosidade; Diversidade de materiais;	Elevadas temperaturas de processamento; Material aprisionado; Material em pó;
<b>Extrusão (FDM)</b>	Boas propriedades mecânicas; Diversidade de materiais; Baixo custo e simplicidade;	Elevadas temperaturas de processamento; Necessita pré filamento; Suportes estruturais;
<b>Inkjet Printing</b>	Variedade de materiais; Rapidez de processamento; Micro-porosidade induzida; Água como ligante;	Baixas propriedades mecânicas; Material aprisionado; Material em pó; Pós processamento

## Capítulo 3 – Materiais e técnicas de caracterização

---

Ao longo deste capítulo são descritos os principais materiais utilizados na produção de *scaffolds*, nomeadamente o PCL e a HA. São ainda indicadas e descritas de forma detalhada as principais técnicas de caracterização utilizadas.

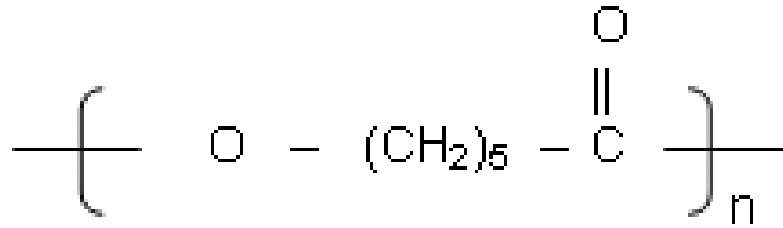
### 3.1 – Materiais

#### 3.1.1 - Policaprolactona

Os polímeros sintéticos biodegradáveis são os materiais mais utilizados no campo da engenharia biomédica devido essencialmente à facilidade de processamento, reprodutibilidade em termos de propriedades físicas e mecânicas, baixa toxicidade, imunogenicidade e risco de infecções. Apresentam igualmente uma elevada versatilidade química que, aliada à possibilidade de manipulação da sua taxa de degradação, permite que cumpram requisitos muito específicos para determinadas aplicações. O espectro de propriedades e aplicações pode ainda ser muito mais amplo se considerarmos a grande variedade de co-polímeros, misturas e compósitos que podem ser produzidos com base nesta classe de materiais.

Dos vários polímeros sintéticos utilizados na produção de *scaffolds* para regeneração óssea e que se encontram mencionados na literatura, destacam-se os poli-hidroxiácidos (PLA, PGA e PLGA) e o PCL, que possuem também aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) para outras aplicações biomédicas como suturas, curativos e endóproteses expansíveis [64, 279-286]. Outros materiais sintéticos também muito utilizados, e que se encontram numa fase de investigação clínica, são os polianidridos, polipropileno fumarato e os polifosfazenos [287-298].

O PCL é um poliéster linear alifático, hidrofóbico, semi-cristalino, biocompatível e biodegradável com uma temperatura de fusão ( $T_m$ ) de  $\sim 60^\circ\text{C}$  e uma temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de cerca  $-60^\circ\text{C}$  [299]. A unidade estrutural molecular do homopolímero de PCL é constituída por cinco grupos metileno apolares e um grupo éster relativamente polar (Figura 3.1).



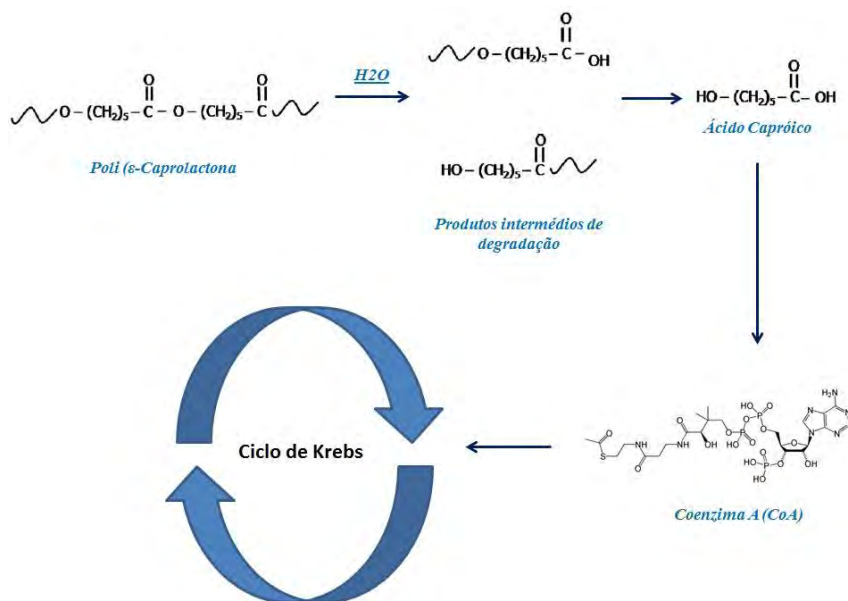
**Figura 3.1:** Estrutura química do Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona).

Esta estrutura confere ao PCL algumas propriedades únicas comparativamente com outros biopolímeros usados em aplicações biomédicas, nomeadamente a alta processabilidade, elevada estabilidade térmica (temperatura de degradação de  $\sim 350^\circ\text{C}$ ), compatibilidade com uma vasta gama de polímeros (facilmente se consegue a formação de diversos tipos de misturas e compósitos) e biodegradabilidade (devido às instáveis ligações éster-alifáticas) [300-301]. O PCL pode ser produzido por abertura do anel do  $\epsilon$ -caprolactona utilizando o octanoato de estanho como iniciador e álcoois de baixo peso molecular para controlar o peso molecular do polímero [302]. A polimerização por abertura de anel pode ser efectuada através de diferentes mecanismos:

- Polimerização aniónica.
- Polimerização catiónica
- Coordenação-inserção.

O mecanismo de polimerização tem um efeito directo no peso molecular, distribuição de peso molecular e composição química dos grupos terminais dos polímeros [303]. O PCL é solúvel numa ampla gama de solventes, nomeadamente clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, etc. Apresenta baixa solubilidade em acetona e 2-butanona sendo totalmente insolúvel em álcool. [304] Tal como a generalidade dos poliésteres, o PCL é susceptível de sofrer hidrólise (Figura 3.2).

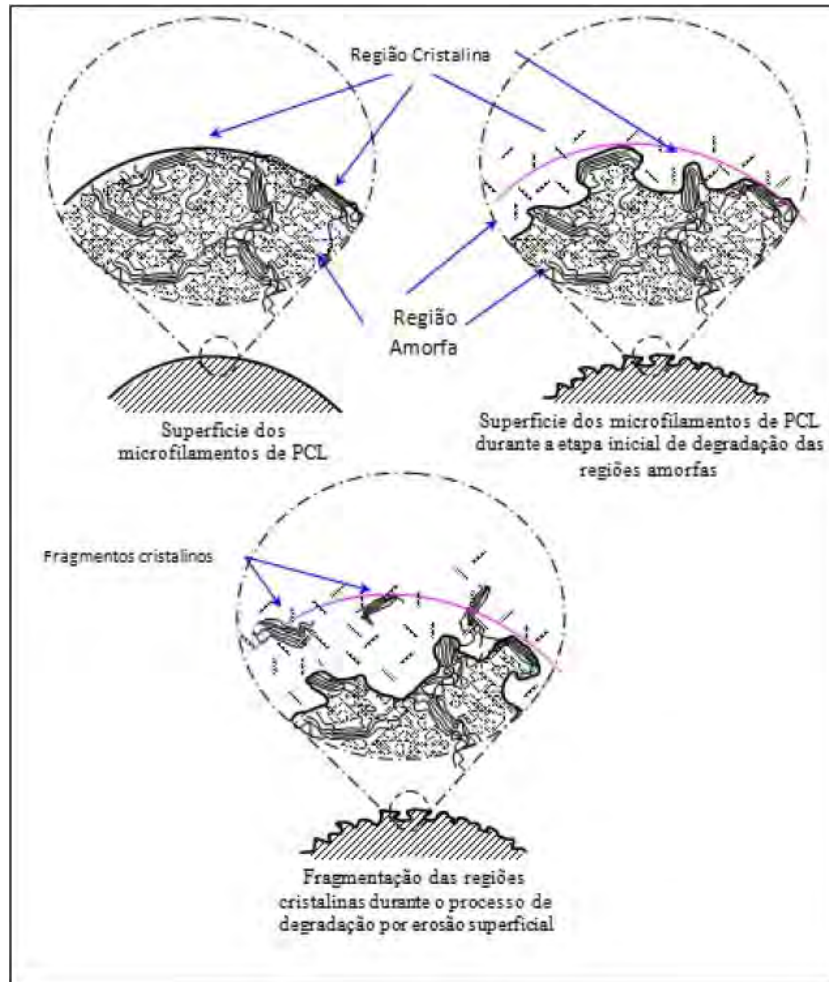




**Figura 3.2:** Representação esquemática do mecanismo de degradação hidrolítica do PCL.

O mecanismo de degradação hidrolítica é complexo e envolve diversos fenómenos, nomeadamente a absorção de água, cisão das ligações éster, difusão e solubilização de pequenas moléculas formadas durante o processo de degradação. O homopolímero de PCL apresenta um tempo de degradação total de 2-4 anos (dependendo do peso molecular inicial do polímero) e os seus produtos de degradação (CO<sub>2</sub>) são excretados do organismo por vias naturais (respiratória e filtração renal) [305]. A sua taxa de degradação pode ser manipulada através da co-polimerização com outras lactonas ou por mistura com outros polímeros [306]. No caso de *scaffolds*, o ataque hidrolítico por parte do meio aquoso pode ocorrer no interior do filamentos (degradação interna) e/ou na sua superfície através de um processo de erosão superficial. A prevalência de um mecanismo em relação a outro depende dos mecanismos de difusão/reacção. Se a taxa de cisão hidrolítica das cadeias poliméricas (à superfície), com consequente produção de oligómeros e monómeros que se difundem para o meio envolvente, for substancialmente superior á taxa de difusão de água para o interior do polímero então o mecanismo de degradação será essencialmente de erosão superficial. No entanto ambos os processos podem ocorrer simultaneamente (Figura 3.3). Importa ainda mencionar que os produtos da reacção de hidrólise (monómeros ácidos e grupos

terminais carboxílicos) promovem o aumento da acidez do meio resultando na autocatálise do processo de degradação.



**Figura 3.3:** Representação esquemática do processo de fragmentação cristalina e degradação das zonas amorfas [307].

A degradação do polímero em fluidos corpóreos é um fenômeno que pode ser influenciado por diferentes variáveis, tais como a estrutura do polímero (composição química, peso molecular e sua distribuição, cristalinidade, morfologia, etc.), características macroscópicas (forma e dimensão do implante, porosidade, etc.) e condições ambientais (temperatura, pH do meio, presença de enzimas, células ou tecidos, etc.) [308-309].

A degradação do PCL tanto *in vitro* como *in vivo* tem sido alvo de diversos estudos [308, 310-313], que permitem concluir que o processo de degradação do PCL ocorre através de duas fases distintas: cisão hidrolítica não-enzimática dos grupos éster, e degradação intracelular quando o polímero é mais cristalino e com menor peso molecular (abaixo dos 3000). Esta segunda fase foi estudada por Woodward que evidenciou a presença de fragmentos de PCL em fagossomas de células macrofágicas e fibroblastos, suportando a teoria de que o PCL pode ser completamente reabsorvido e degradado por mecanismos intracelulares, desde que o seu peso molecular seja inferior a 3000 [313].

Devido à sua baixa biodegradabilidade, biocompatibilidade, compatibilidade com outros polímeros e fármacos, o PCL apresenta-se como um dos materiais mais usados em sistemas de entrega controlada de fármacos de longa duração (acima de 1 ano) [314-315]. No domínio da regeneração óssea o PCL tem sido utilizado na preparação de compósitos à base de materiais cerâmicos com o intuito de aumentar a resistência mecânica, osteocompatibilidade/osteocodutividade e taxa de degradação dos implantes [316-318].

Pelas diversas vantagens acima descritas, nomeadamente a elevada estabilidade térmica e química, facilidade de processamento, biocompatibilidade e biodegradabilidade foi decidido utilizar neste trabalho o PCL como material de base para produção de *scaffolds* 3D para regeneração óssea. O PCL (CAPA 6500, Mw = 50.000 Da), na forma de granular (3mm), foi adquirida à Perstorp Caprolactones (Cheshire, Reino Unido) e utilizada sem modificações adicionais.

### *3.1.2 – Hidroxiapatita*

Os materiais cerâmicos têm uma vasta aplicação em ET nomeadamente no campo da regeneração/reparação óssea. Apesar de não existir uma definição completa para materiais cerâmicos, estes são normalmente considerados materiais sólidos constituídos por substâncias inorgânicas, não-metálicas podendo existir sob a forma de compostos cristalinos e amorfos [319]. Os cerâmicos utilizados em aplicações médicas são vulgarmente designados de biocerâmicos, podendo ser classificados como bioinertes (ex: Alumina) ou bioactivos (ex: fosfatos de cálcio, biovidros) de acordo com o tipo de interacção que estabelecem com o tecido nativo [320].

Dentro da classe dos materiais cerâmicos bioativos, os fosfatos de cálcio, mais especificamente a HA e o TCP, são os mais utilizados [320].

O osso natural é constituído por uma fase orgânica (1/3 da massa total) e por uma fase inorgânica (2/3 da massa total). A fase inorgânica é essencialmente constituída por fosfato de cálcio (85-90%), carbonato de cálcio (8-10%), fosfato de magnésio (1,5%) e uma percentagem residual de fluoreto de cálcio (0,3%) [321]. Os minerais estão presentes na forma de cristais de apatita, primariamente HA. Os fosfatos de cálcio são reconhecidos pela sua excelente biocompatibilidade e bioactividade, possuindo a capacidade de se ligarem ao osso e promoverem a formação de tecido. A estrutura química e o rácio entre cálcio e fósforo (Ca/P) dos diferentes fosfatos de cálcio sintéticos são muito idênticos à fase mineral do osso natural acima descrita, promovendo deste modo um mecanismo de interface que conduz à libertação de cálcio e fósforo [322]. Este mecanismo de libertação resulta numa elevada conexão entre o material cerâmico e o tecido ósseo (conexão osteogénica). A eliminação dos fosfatos de cálcio por parte do organismo é conduzida por dois mecanismos diferentes, nomeadamente a dissolução e a reabsorção. Enquanto a dissolução é um mecanismo químico que ocorre num meio líquido, a reabsorção é um mecanismo celular (promovido pelos osteoclastos) e que pode variar de acordo com o tipo de material cerâmico [320]. Do ponto de vista termodinâmico, a HA  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  é o fosfato de cálcio mais estável em condições de temperatura e pH similares às encontradas no organismo humano.

Uma das desvantagens dos materiais cerâmicos e que tem vindo a limitar a sua aplicação na regeneração de tecido ósseo, especialmente em locais sujeitos a elevadas tensões, é a sua baixa resistência mecânica e fragilidade [323].

Neste trabalho a HA sintética na forma de pó com partículas manométricas (<200 nm) foi adquirida à Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Quimica, S.A. Portugal), e usada na preparação de misturas nano-compósitas sem alterações adicionais. A HA sintética na forma de pó (nanoXIM HAp 402) com granulometria micrométrica ( $5\pm 1,0 \mu\text{m}$ ) foi cedida pela empresa Fluidinova (Fluidinova, SA, Portugal) e aplicada na preparação de micro-compósitos à base de PCL.

## **3.2 – Técnicas de caracterização**

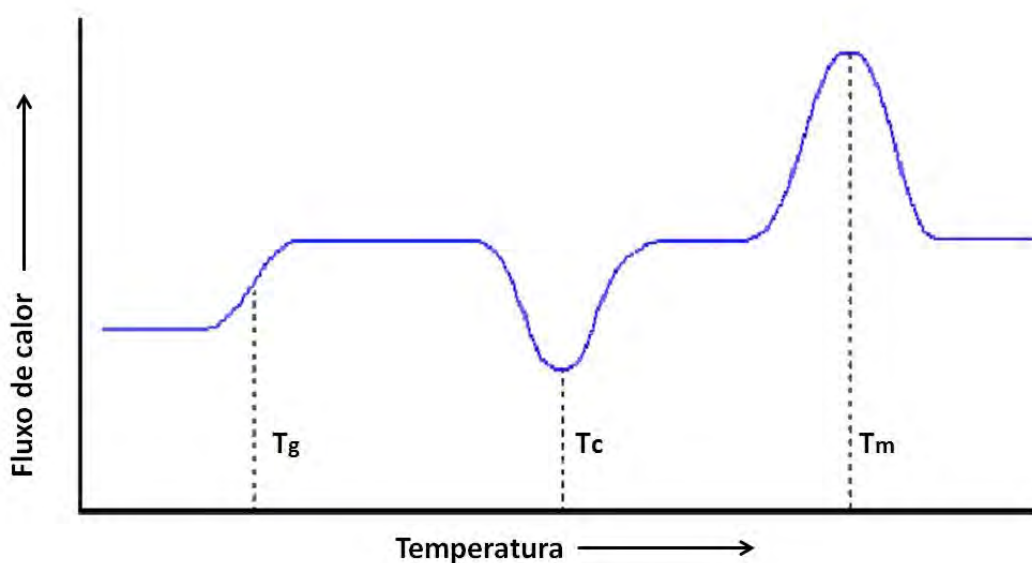
No âmbito deste trabalho de investigação, foi utilizado um número muito significativo de técnicas que permitiram caracterizar as estruturas produzidas pelo sistema desenvolvido (Capítulo 4) do ponto de vista morfológico, térmico e químico.

### *3.2.1 - Calorimetria diferencial de varrimento*

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) permite monitorizar e determinar os efeitos térmicos associados às transições de fase e reacções químicas que ocorrem nos materiais em função da temperatura. Num sistema DSC, a diferença entre o fluxo térmico fornecido à amostra e ao material de referência é registada e expressa em função da temperatura, enquanto a substância em estudo e a referência são submetidas a um mesmo programa de aquecimento ou arrefecimento, rigorosamente controlado. A referência pode ser um material inerte (ex: Alumina) ou um cadinho de alumínio vazio. Deste modo é possível extrair dados qualitativos e quantitativos relacionados com processos endotérmicos e exotérmicos e por consequência determinar alterações ao nível das seguintes propriedades físicas e/ou químicas dos materiais [324]:

- Temperatura de fusão, cristalização e transição vítrea.
- Grau de cristalinidade de polímeros.
- Diagramas de fase.
- Estabilidade térmica e oxidativa.
- Entalpias de transição de fase e de reacção.

A Figura 3.4 representa uma curva típica de DSC de uma amostra polimérica.

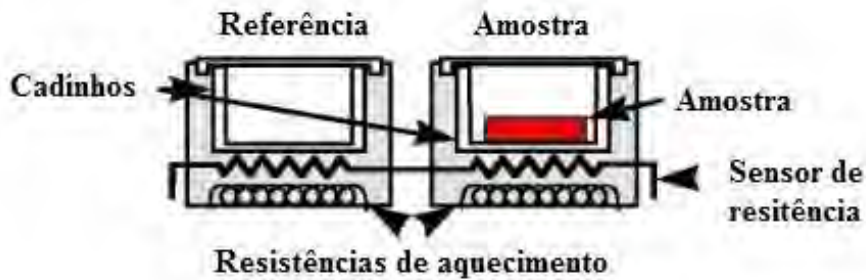


**Figura 3.4:** Curva típica obtida a partir de uma análise DSC de um polímero.

No termograma indicado na Figura 3.4 encontra-se representado o valor do fluxo de calor (ordenadas) em função da temperatura a pressão constante. O valor do fluxo térmico é proporcional ao calor específico da amostra (quantidade de energia térmica necessária para obter um determinado aumento de temperatura). Cada transição de fase, acompanhada por uma variação no calor específico, produz uma descontinuidade no sinal da alimentação [325]. Estas descontinuidades estão associadas a variações endotérmicas ou exotérmicas da entalpia, produzindo deste modo os picos que se visualizam na Figura 3.4 e a partir dos quais se pode determinar a variação total de entalpia e a quantidade de material presente (estes valores são proporcionais ao valor da área abaixo de cada pico).

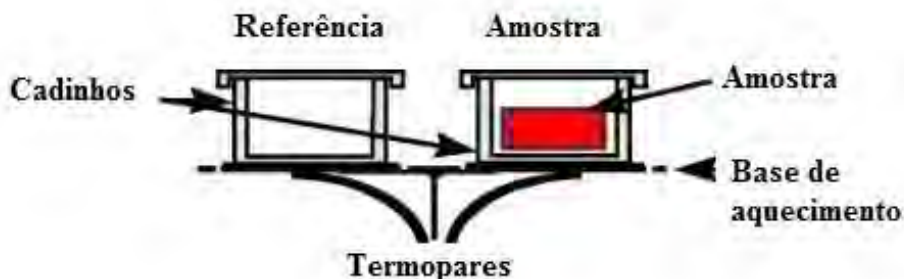
Existem dois tipos de equipamentos de DSC com princípios de operação distintos [325]: DSC de compensação de energia e DSC de fluxo de calor. No primeiro caso, as células onde são colocadas a amostra e a referência encontram-se equipadas com sensores de resistência e resistências de aquecimento individuais (Figura 3.5). Este sistema permite que, ao ser detectada uma diferença de temperatura entre a amostra e a referência, seja de imediato adicionada energia térmica a uma das células de modo a manter um diferencial de temperaturas nulo entre ambas. Dado que essa quantidade de energia é equivalente à quantidade de energia absorvida ou libertada pela amostra,

o seu registo permite efectuar uma medida calorimétrica directa da energia associada às diferentes transformações do material.



**Figura 3.5:** Representação esquemática de DSC de compensação de energia [324].

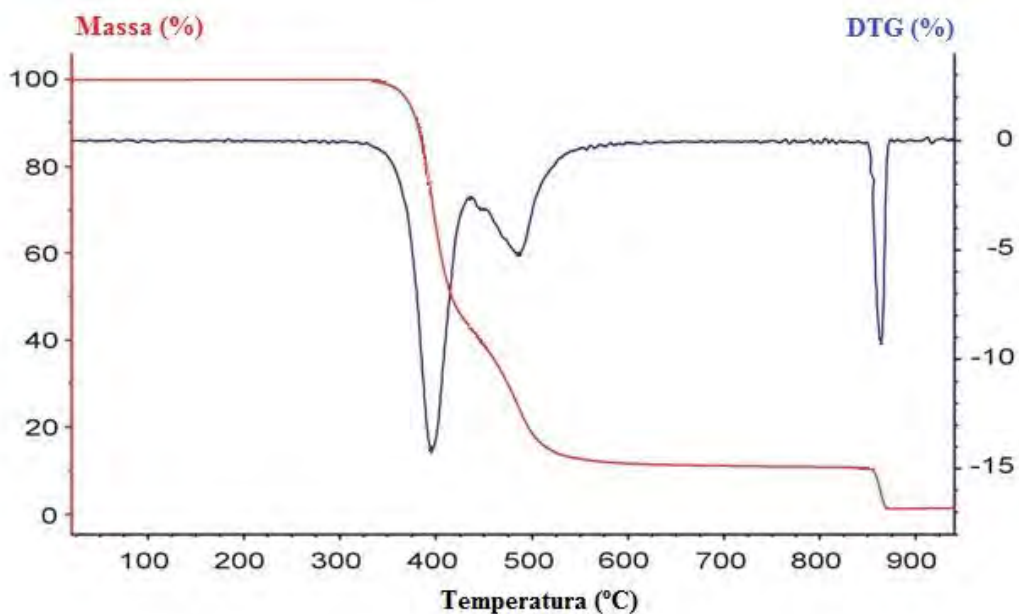
No segundo tipo de DSC (fluxo de calor) é utilizado apenas um forno. No forno os cadinhos são dispostos sobre uma base de um metal altamente condutor, geralmente platina (Figura 3.6). A amostra e a referência são então aquecidas pelo mesmo sistema de fornecimento de energia. A diferença de temperatura entre a amostra e a referência é medida em função da temperatura ou do tempo, sob condições de temperatura controlada, sendo a diferença de temperatura proporcional à variação do fluxo de energia térmica. Durante uma transformação de fase a amostra pode libertar ou absorver energia térmica provocando alterações ao fluxo de energia térmica e, conseqüentemente, variações na diferença de temperatura entre a amostra e a referência permitindo assim estimar a entalpia associada a essa transformação.



**Figura 3.6:** Representação esquemática de DSC por fluxo de calor [324].

### 3.2.2 – Termogravimetria

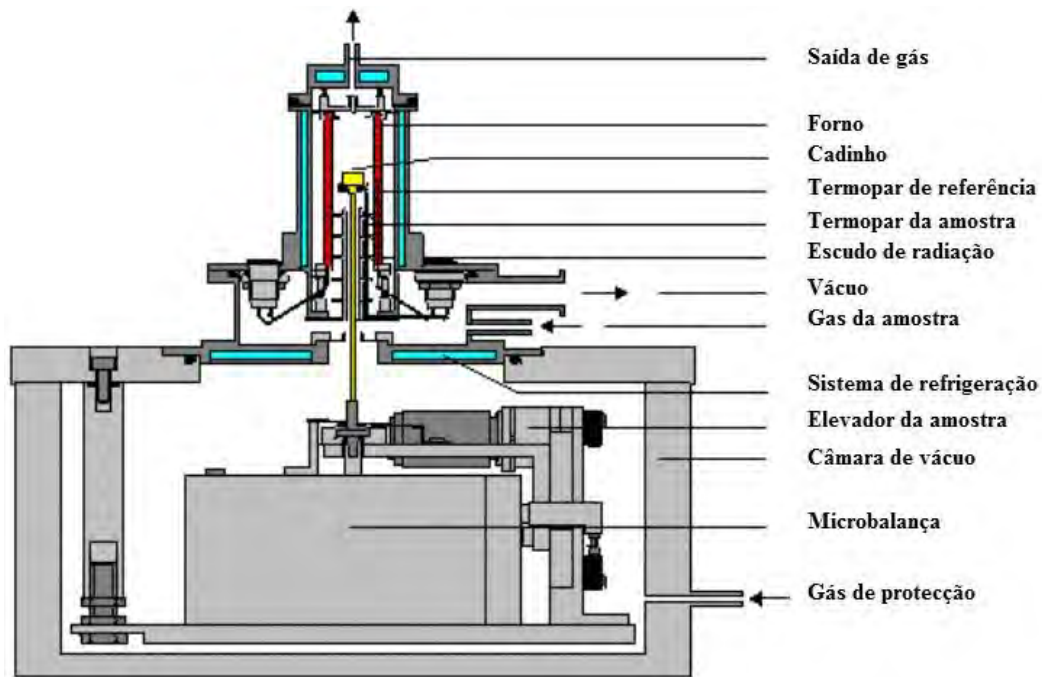
Termogravimetria (TGA) é a técnica através da qual é possível determinar variações de massa de uma substância em função da temperatura/tempo quando submetida a um programa de aquecimento controlado. Para tal a amostra é colocada numa microbalança, que se encontra dentro de um forno. Em seguida estabelecem-se as condições de aquecimento (temperaturas, regimes de temperaturas, taxa de aquecimento, etc.). Os resultados obtidos podem ser apresentados na forma de uma curva termogravimétrica (TG), na qual é reportada a variação de massa (em percentagem) da amostra em função da temperatura/tempo, ou na forma de uma curva termogravimétrica derivada (DTG), onde a primeira derivada da curva TG é apresentada em função da temperatura/tempo (Figura 3.7).



**Figura 3.7:** Termograma ilustrativo das curvas de TG (vermelho) e respectiva derivada (azul).

O equipamento utilizado na análise termogravimétrica é assim basicamente constituído por uma microbalança, um forno, termopares e um sistema de fluxo de gás (Figura 3.8).





**Figura 3.8:** Representação esquemática de um sistema de TGA [326].

O peso, a dimensão e o modo de preparação da amostra podem influenciar de forma muito significativa os resultados obtidos. Deste modo devem utilizar-se, tanto quanto possível, amostras com massa e dimensões reduzidas de modo a evitar um desvio de linearidade durante o aquecimento.

Esta técnica permite determinar a composição de misturas complexas (determinação do teor de voláteis e cargas em materiais poliméricos), teor de resíduos inorgânicos, estabilidade térmica de materiais, etc.

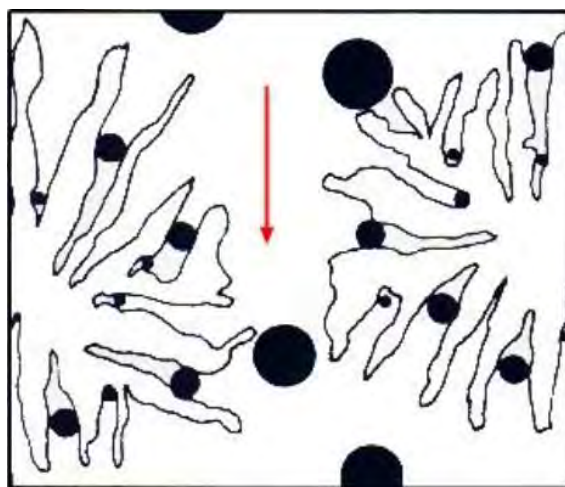
[327-328]

### 3.2.3 – Cromatografia de exclusão por tamanho

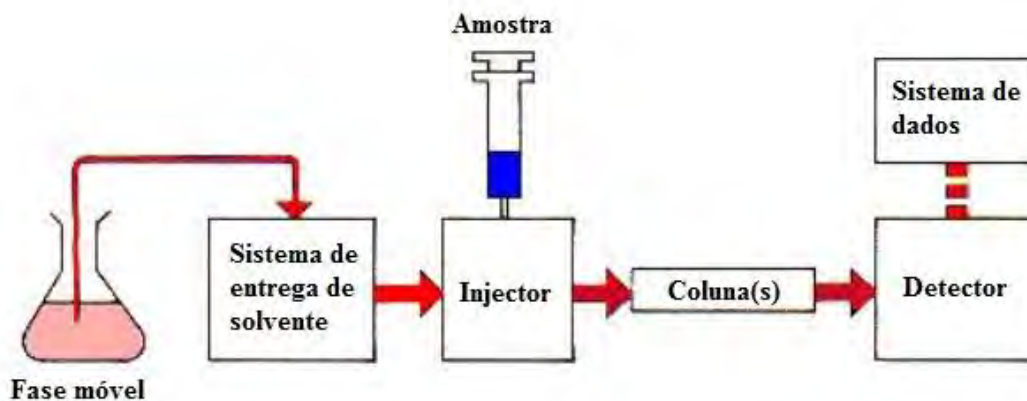
O processo comum a todas as técnicas de cromatografia consiste na separação de substâncias orgânicas [329]. Para tal, as substâncias a serem separadas são transportadas por intermédio de uma fase móvel ao longo de uma outra fase estacionária. As substâncias de uma determinada amostra irão mover-se com maior ou menor velocidade de acordo com o grau de afinidade que apresentarem com a fase móvel e estacionária. No caso específico da cromatografia de exclusão por tamanho

(SEC, do inglês *Size Exclusion Chromatography*), a separação dos constituintes da amostra ocorre com base na dimensão dos poros da fase estacionária [330]. No caso da cromatografia líquida, a fase móvel é constituída por um líquido sendo a fase estacionária constituída por um gel polimérico não iónico com alta porosidade [330]. Normalmente a cromatografia líquida é efectuada por eluição, sendo a fase móvel eluída através de uma coluna contendo a fase estacionária.

Na técnica de SEC a separação ocorre exclusivamente por tamanho molecular de uma substância em solução (volume hidrodinâmico), sendo o mecanismo de separação indicado na Figura 3.9. Neste caso a separação ocorre durante a passagem da fase móvel (contendo as substâncias a separar) através da fase estacionária. As moléculas mais pequenas penetram mais facilmente dentro das partículas porosas (fase estacionária) comparativamente com as moléculas de maior dimensão, permanecendo deste modo mais tempo dentro das colunas do cromatógrafo. Após serem separadas, as moléculas são caracterizadas à saída das colunas por intermédio de um detector ou uma série de detectores. Dependendo da escolha dos detectores, diferentes tipos de cálculos podem ser realizados de modo a obter informação sobre peso molecular ( $M_w$ ), distribuição do peso molecular, viscosidade intrínseca ( $IV$ ), raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) e raio de giração ( $R_g$ ). Os cromatógrafos de permeação em gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*) consistem num sistema de entrega de solvente (bombas), injector, colunas e detector (es) (Figura 3.10).



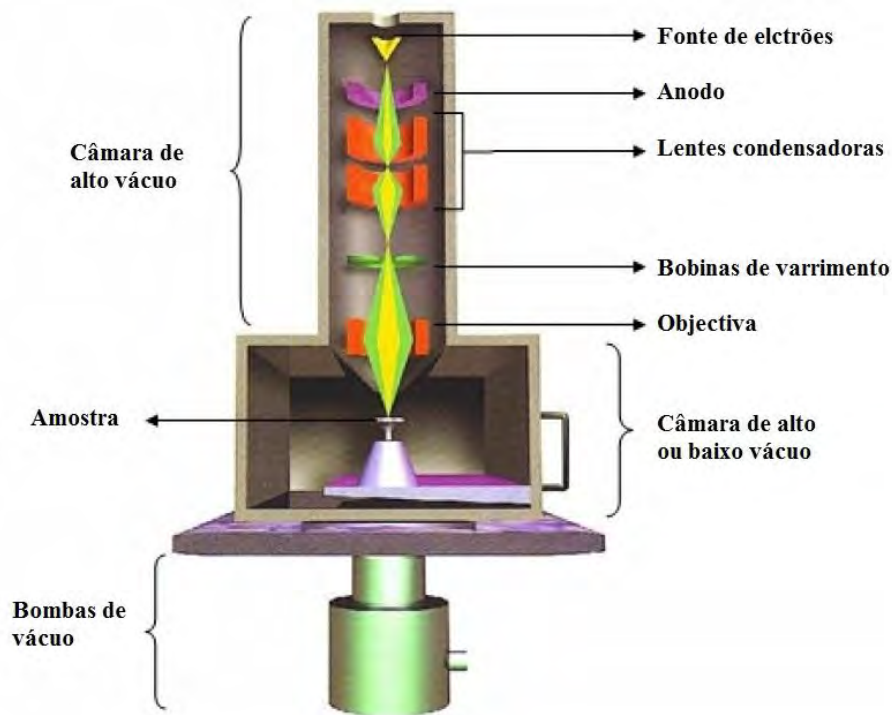
**Figura 3.9:** Secção transversal da estrutura porosa (fase estacionária). Mecanismo de separação por SEC [330].



**Figura 3.10:** Representação esquemática de um sistema de GPC.

### 3.2.4 – Microscopia electrónica de varrimento

A base de funcionamento de um microscópio electrónico de varrimento assenta na utilização dos sinais gerados pela interacção entre um feixe de electrões e uma amostra para obter informações adicionais sobre os materiais. O feixe de electrões utilizado no SEM (5-50 KeV) varre a superfície do material produzindo raios-X, electrões de retrodifusão e electrões secundários que por sua vez são detectados e analisados por diferentes técnicas. O SEM possui o mesmo princípio de funcionamento do microscópio óptico, com a excepção de utilizar electrões em vez de luz para produzir a imagem e de recorrer a lentes magnéticas para focalizar o feixe no lugar de lentes de vidro. Mediante a aplicação de uma diferença de potencial variável (0,5 a 30 KV) é gerado um feixe de electrões que é emitido através de um filamento capilar de tungsténio (eléctrodo negativo). O feixe de electrões gerado é posteriormente acelerado dentro da coluna de alto vácuo através da variação da diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo (0,3 e 30 KV). Este feixe é em seguida focalizado sobre a amostra com recurso a uma lente objectiva. Acima desta lente existe um conjunto de bobinas electromagnéticas que guiam o varrimento do feixe ao longo da amostra. As lentes condensadoras são utilizadas para alinhar os feixes de electrões em direcção à objectiva. Na Figura 3.11 é apresentada uma representação esquemática de um SEM com o conjunto de componentes base descritos anteriormente.

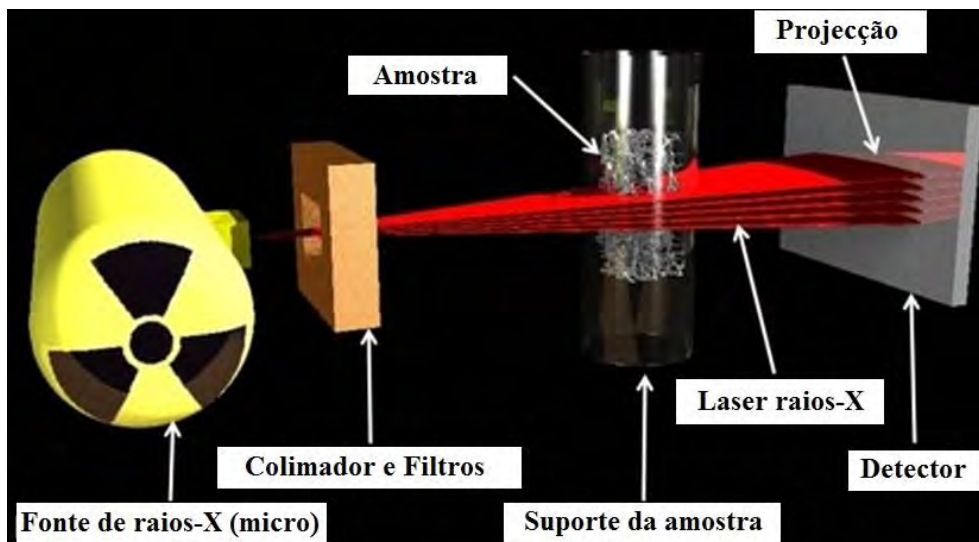


**Figura 3.11:** Representação esquemática de um SEM.

O sistema de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS, do inglês *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*) é um acessório muito utilizado nos microscópios electrónicos de varrimento, que permitem efectuar a análise elementar ou caracterização química da superfície de um material. O feixe de electrões ao incidir sobre um material promove a excitação dos electrões constituintes do material provocando a sua mudança de nível energético. Estes electrões, ao retornarem à sua posição inicial, libertam a energia previamente adquirida na forma de raios-X. Esta energia é detectada por intermédio de um detector instalado na câmara de vácuo do SEM. A energia libertada pelos electrões está directamente ligada com a estrutura atómica do elemento a partir do qual estes electrões foram emitidos. Deste modo, é possível determinar a composição elementar da amostra. O sistema EDS permite ainda efectuar o mapeamento da distribuição dos elementos químicos constituintes do material.

### 3.2.5 – Microtomografia computadorizada 3D

A microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT, do inglês *Micro-Computed Tomography*) é uma área relativamente recente no campo da imagiologia não destrutiva. Os princípios tomográficos são aplicados de modo a obter a reconstrução 3D de uma determinada amostra. O termo “*micro*” é utilizado para evidenciar a elevada resolução destes sistemas comparativamente com os equipamentos convencionais de uso clínico. O princípio físico básico subjacente a um sistema de microtomografia consiste na interacção da radiação ionizada, nomeadamente radiação raios-X, com um determinado material. À medida que os raios-X penetram no objecto, estes vão sendo atenuados de acordo com o material presente na direcção de penetração. Assim, uma projecção de raios-X representa uma imagem que contém a soma de todas as atenuações encontradas ao longo da direcção de penetração do laser. De modo a produzir uma imagem 3D de  $\mu$ CT, é necessário efectuar a aquisição de um conjunto de projecções 2D. De modo geral, em  $\mu$ CT, estas projecções são obtidas utilizando sistemas que possuem a fonte e o detector de raios-X em posições fixas enquanto o objecto é rodado ao longo do seu maior eixo (Figura 3.12).



**Figura 3.12:** Representação esquemática dos principais componentes de um sistema de  $\mu$ CT [331].

### **3.3 – Sumário**

Para se testar e validar o dispositivo de fabricação do sistema BioCell Printing introduzido no Capítulo 1 e descrito com detalhe no Capítulo 4, foram selecionados como materiais o PCL, polímero sintético, biodegradável e biocompatível, que alia a elevada estabilidade térmica e química a uma excelente processabilidade, e a HA, material cerâmico utilizado para a obtenção de estruturas compósitas 3D com elevada bioactividade e desempenho mecânico. As principais técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho de investigação são igualmente apresentadas.

## Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – sistema BioCell Printing.

---

As metodologias de produção de *scaffolds* ou matrizes 3D para regeneração de tecidos correspondem usualmente a processos complexos e descontínuos com elevada intervenção humana [332]. Este capítulo, que descreve um novo sistema de fabricação para ET e encontra-se dividido em duas partes.

Na primeira parte descreve-se o sistema integrado e automático para produção e cultura celular *in vitro*, desenvolvido no âmbito deste trabalho de investigação e designado por BioCell Printing. Este sistema integra em 4 zonas distintas: um sistema de fabricação aditiva multi-material baseado no processo de extrusão, um sistema de esterilização, um dispositivo de deposição celular e um bioreactor para cultura celular dinâmica (não considerado em termos de desenvolvimento neste trabalho).

Na segunda parte é reportado o trabalho efectuado ao nível do design, concepção e validação dos componentes de software e hardware que compõem a zona de construção do sistema, e que constitui o objectivo central deste trabalho de investigação. São também apresentados alguns exemplos de estruturas produzidas pelo sistema BioCell Printing e que demonstram a versatilidade e reprodutibilidade do sistema desenvolvido.

### 4.1 – Introdução

A ET é muitas vezes descrita como uma área multidisciplinar, que combina as ciências da vida e engenharia com o objectivo de produzir substitutos biológicos capazes de promover a regeneração de tecidos ou órgãos [50]. O rápido crescimento desta área deve-se em grande parte à incapacidade que as actuais terapêuticas clínicas possuem em dar resposta às crescentes necessidades dos serviços de saúde mundial [333]. Esta incapacidade prende-se com diversos factores, nomeadamente a escassez de doadores de órgãos ou tecidos para transplante, baixo desempenho de determinados

#### Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing

dispositivos médicos, elevados custos associados e um aumento exponencial da população mundial [334-337].

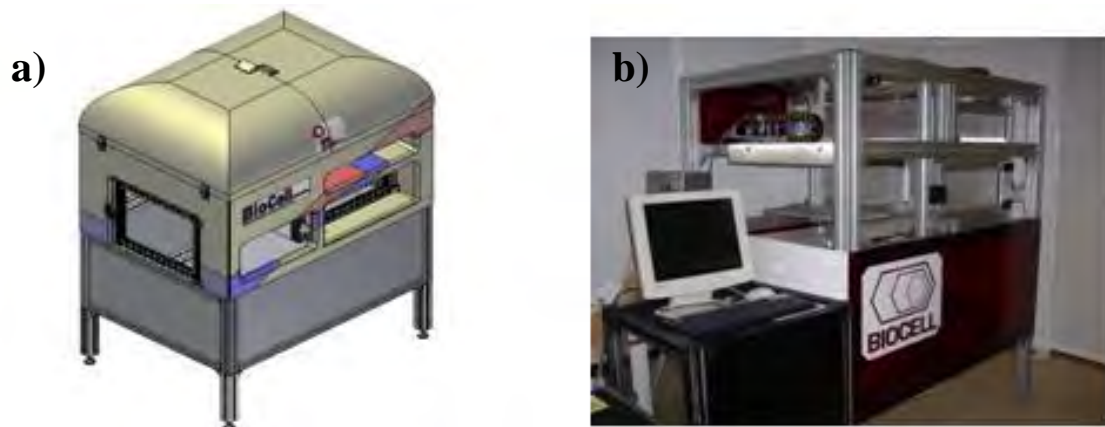
Actualmente a ET apresenta um enorme potencial no desenvolvimento de novos produtos capazes de colmatar as deficiências apresentadas pelas terapêuticas convencionais. A metodologia mais utilizada pressupõe a combinação de *scaffolds* com células do próprio paciente de modo a promover a regeneração do tecido danificado [338]. Os *scaffolds* são estruturas 3D que devem possuir características químicas, mecânicas e biológicas muito específicas de modo a promover um adequado crescimento do neo-tecido tanto *in vitro* como *in vivo* [339-340, 2], tal como se descreve com detalhe no Capítulo 2.

As tecnologias de fabricação aditiva têm vindo a ser aplicadas com enorme sucesso na produção de *scaffolds* para ET [341-343]. Este facto deve-se à possibilidade de conjugação destas técnicas com sistemas de imagiologia, CAD/CAE (CAE, do inglês *Computer Aided Engineering*), para produção rápida de implantes personalizados com geometrias complexas e elevada reprodutibilidade [344]. Apesar de todos os avanços verificados nos últimos anos, especialmente ao nível da biologia celular, biomateriais e tecnologias de produção, a ET possui ainda claros constrangimentos que limitam a aplicação clínica de muitos dos seus produtos. Uma dessas limitações prende-se com o facto de a principal metodologia de produção de *scaffolds* para ET ser um processo manual e descontínuo envolvendo diferentes etapas, nomeadamente a produção de *scaffolds*, deposição e cultura celular [345]. Obviamente, a inexistência de condições assépticas durante a fase de transferência das estruturas entre as diferentes etapas (elevado risco de contaminação) associada ao processo manual de deposição celular (baixa reprodutibilidade e elevados tempos de produção), diminuem substancialmente as possibilidades de aplicação clínica directa deste tipo de produtos. De modo a ultrapassar estas limitações, foi objectivo central deste trabalho o desenvolvimento de um sistema integrado e automatizado para produção e cultura celular *in vitro* de implantes biológicos 3D, denominado BioCell Printing. Este sistema foi desenvolvido no âmbito de um projecto de investigação designado por BIOMAS (Biomanufacturing and Engineering of *Scaffolds*) financiado pela Agência de Inovação.



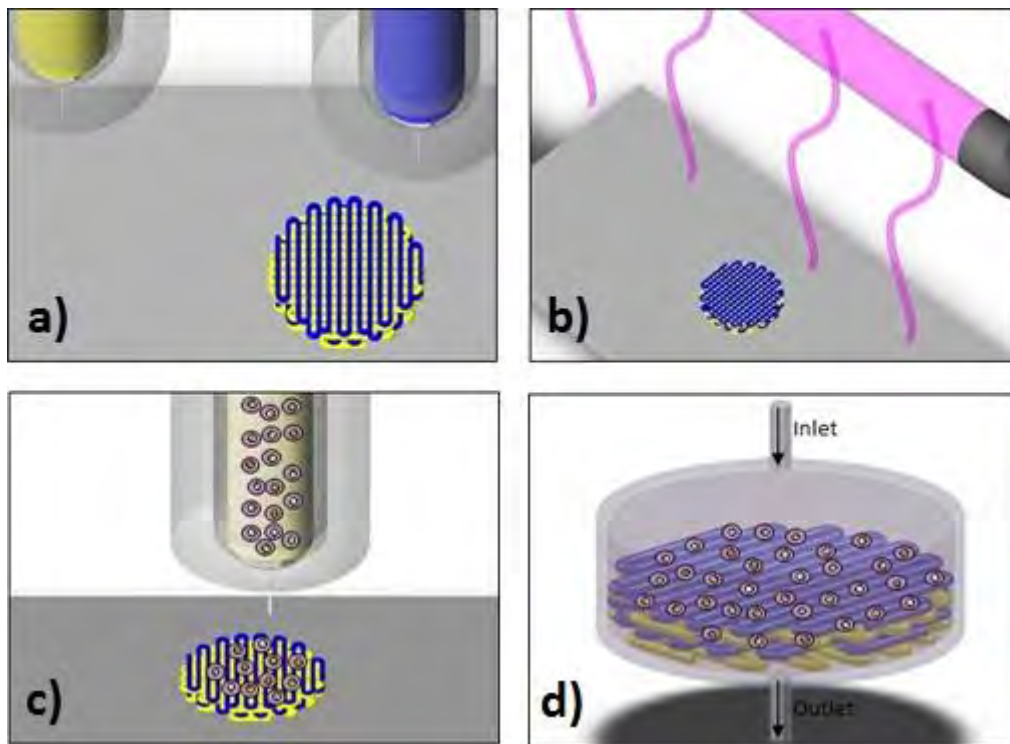
## 4.2 – Sistema BioCell Printing

A BioCell Printing é um sistema integrado, automatizado e sincronizado, que permite a produção e cultura celular de implantes biológicos 3D com reduzida intervenção manual (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Sistema BioCell Printing. a) modelo CAD 3D; b) unidade protótipo.

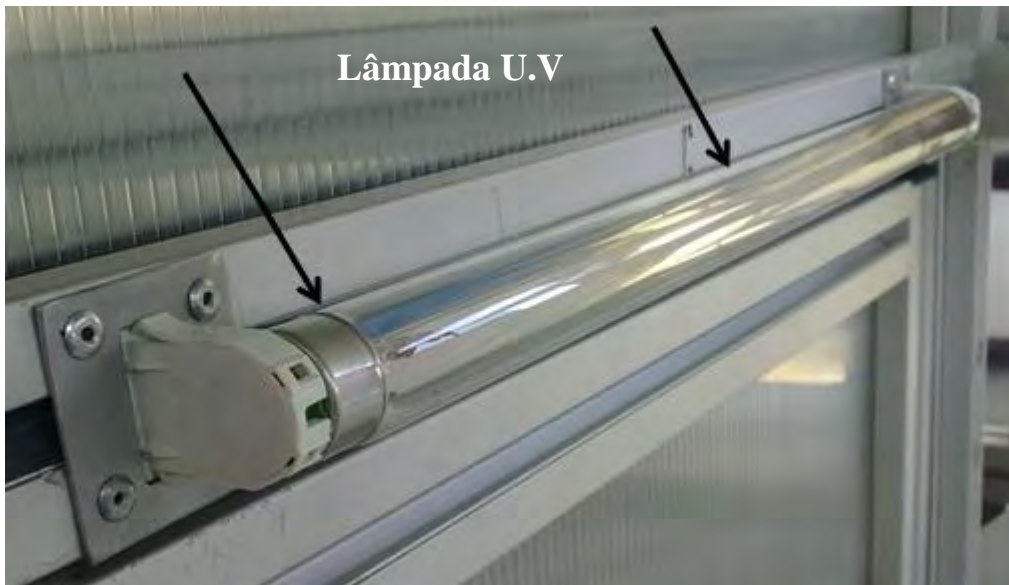
Tal como se encontra ilustrado na Figura 4.2, o sistema foi concebido para integrar quatro zonas de operação fundamentais. Na zona 1, são produzidas estruturas 3D, com ou sem células encapsuladas, através da utilização de um sistema de extrusão multimaterial. De seguida, e dependendo da estratégia utilizada (estruturas com ou sem células), a plataforma de construção desloca-se para a zona 2 onde as estruturas são esterilizadas por intermédio de processos químicos (óxido de etileno ou CO<sub>2</sub> supercrítico) ou físicos (radiação U.V,  $\beta$  ou  $\gamma$ ). A terceira fase contempla a deposição celular homogénea através do uso de um sistema de deposição robotizado. Finalmente, na quarta zona é realizada a cultura celular dinâmica *in vitro* com recurso a um bioreactor.



**Figura 4.2:** Representação esquemática das 4 zonas da BioCell Printing. a) Construção de *scaffolds* (Zona 1); b) Esterilização (Zona 2); c) Deposição celular (Zona 3); d) Cultura celular (Zona 4) [346].

As condições óptimas de temperatura, humidade e CO<sub>2</sub> são asseguradas ao longo de todo o processo através da introdução de uma câmara de incubação.

Actualmente a zona de esterilização contempla apenas um sistema de luz U.V composto por quatro lâmpadas dispostas na parte superior da estrutura (Figura 4.3). A implementação dos restantes sistemas de esterilização serão objecto de desenvolvimento futuro que visará igualmente perceber o seu efeito nas propriedades químicas e biológicas do material.



**Figura 4.3:** Sistema de esterilização por lâmpadas U.V.

O sistema de deposição celular é constituído por uma bomba peristáltica, um reservatório contendo células em suspensão com terreno de cultura e um *nozzle* (Figura 4.4). A deposição celular é controlada automaticamente através do software de controlo do equipamento. Deste modo, é possível definir estratégias de deposição específicas para cada tipo de implante, aumentando a reprodutibilidade do processo de deposição celular (bem como a homogeneidade da distribuição celular), minimizando-se assim os erros associados ao operador.

Foi ainda concebido, mas não materializado, um bioreactor multifuncional que irá ser acoplado à BioCell Printing (Figura 4.4). Este sistema de cultura dinâmica integra dois tipos de bioreactores diferentes:

- Perfusão
- Rotação.

O bioreactor de perfusão permite ainda a estimulação mecânica das estruturas através da imposição de ciclos contínuos ou alternados de forças de compressão ou tracção. Deste modo passa a ser possível, através de um único sistema multifuncional, seleccionar o tipo de bioreactor a utilizar (perfusão ou rotação), definir diferentes

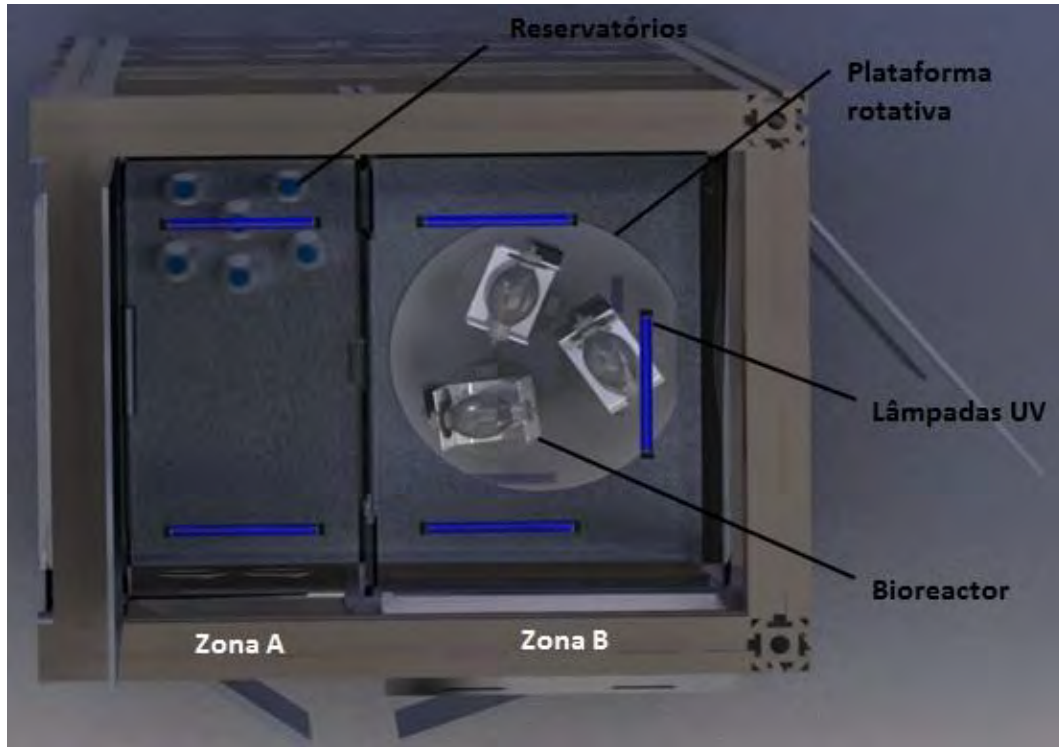
estímulos mecânicos e biológicos a aplicar, bem como realizar, simultaneamente, cultura celular em diferentes estruturas de modo simultâneo (devido à existência de múltiplos bioreactores de perfusão e rotação).



**Figura 4.4:** Representação do acoplamento do bioreactor multifuncional ao sistema BioCell Printing.

De modo a garantir as adequadas condições ambientais (humidade, temperatura, CO<sub>2</sub>) ao longo de todo o processo de cultura celular, foi concebida uma incubadora com duas zonas: zona de cultura celular e zona de armazenamento (Figura 4.5). A zona de cultura celular é constituída por uma plataforma rotativa que serve de suporte aos diferentes bioreactores. A rotação da plataforma permite um acesso privilegiado e selectivo do operador ao bioreactor. A zona de armazenamento é o local onde são colocados e devidamente acondicionados os reservatórios com terreno de cultura para alimentar os bioreactores. Esta alimentação é efectuada através de bombas peristálticas com controlo independente. Foram ainda colocadas cinco lâmpadas U.V na parte superior da estrutura (três na zona de cultura e duas na zona de

armazenamento), de forma a permitir a esterilização do ambiente após o término da cultura celular.



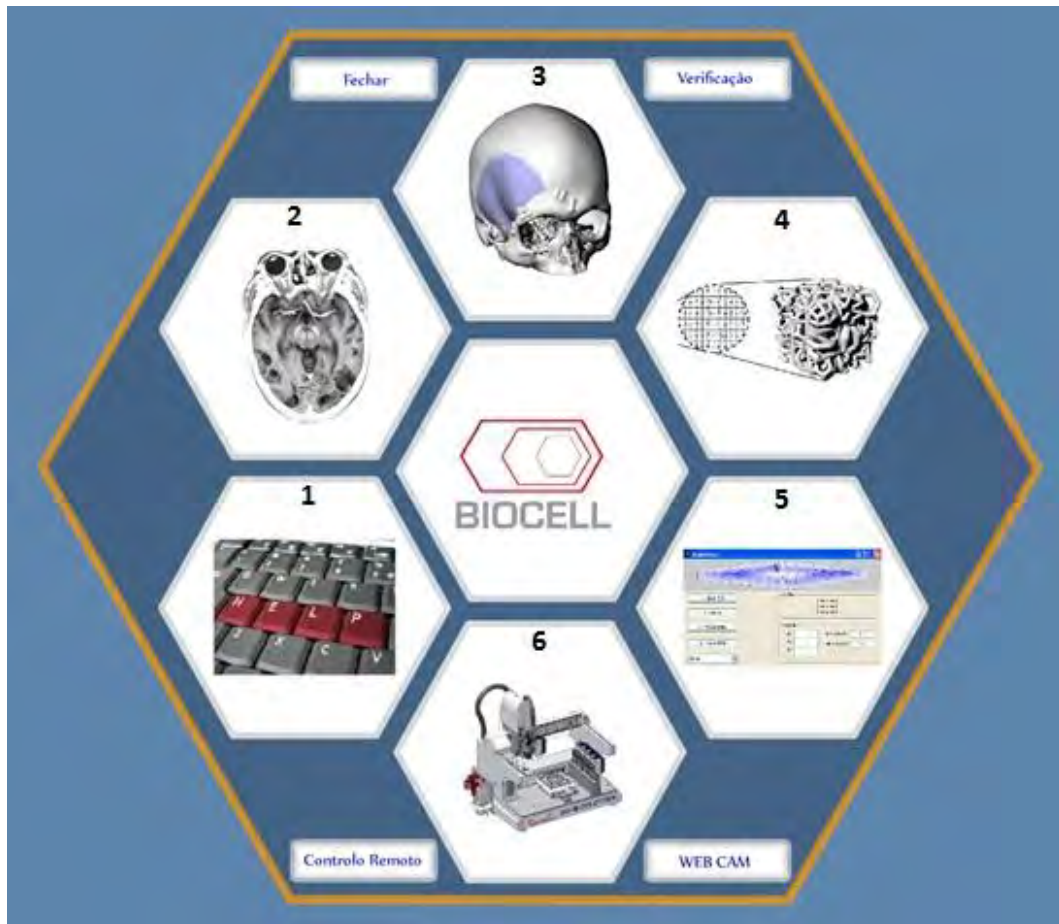
**Figura 4.5:** Representação esquemática do bioreactor multifuncional. As zonas A e B indicadas na figura correspondem à zona de armazenamento de cultura celular, respectivamente.

Tal como foi anteriormente referido, o sistema BioCell Printing assenta numa forte componente de integração do processo de construção dos substitutos biológicos e numa plataforma de comunicação e gestão da informação que tem como principal objectivo a regulação do trabalho entre diversos profissionais nomeadamente médicos, engenheiros de materiais, engenheiros de processo, entre outros. Esta plataforma encontra-se dividida em seis domínios distintos que permitem, de uma forma integrada, o design e a produção de bioimplantes para ET (Figura 4.6):

- 1- Página do projecto;
- 2- Leitura e tratamento de dados imagiológicos;
- 3- Modelação CAD do bioimplante;



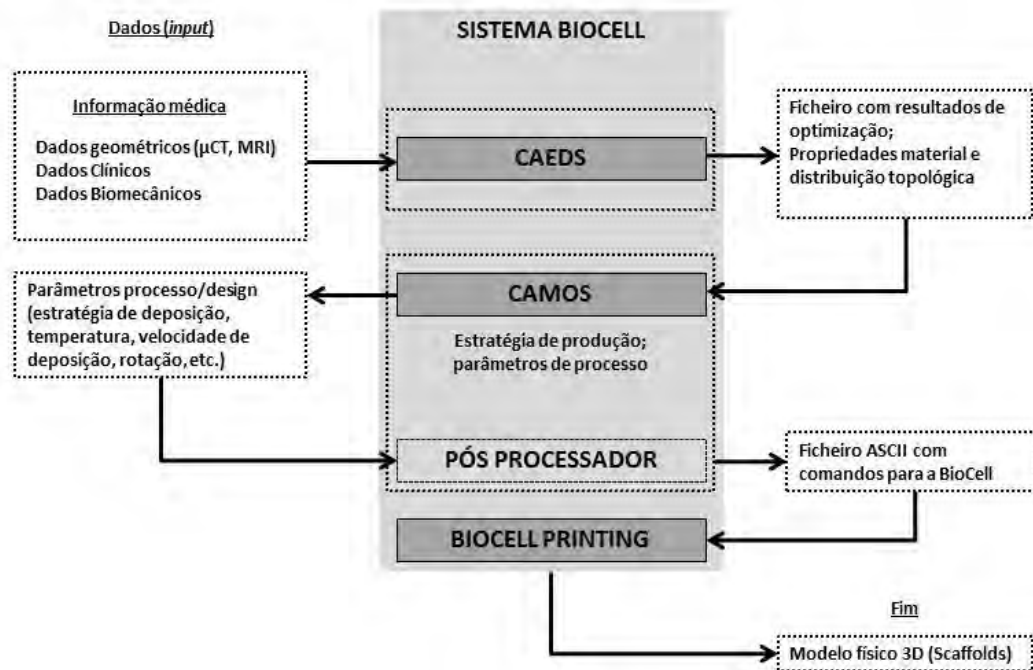
- 4- Análise estrutural por elementos finitos;
- 5- Fatiamento e definição de trajetórias de construção;
- 6- Reprodução física do implante;



**Figura 4.6:** Interface da plataforma com ilustração dos seis domínios de comunicação e gestão da informação do sistema BioCell Printing.

Para além dos principais domínios anteriormente mencionados, a plataforma de comunicação e gestão de informação permite ainda o controlo remoto do processo de produção através da utilização de diversas *webcams* instaladas nas diferentes zonas do sistema BioCell Printing, bem como o acesso remoto ao servidor da plataforma. Na Figura 4.7 encontram-se ilustrados as diferentes fases necessárias executar para produzir bioimplantes com a BioCell Printing.

## Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing

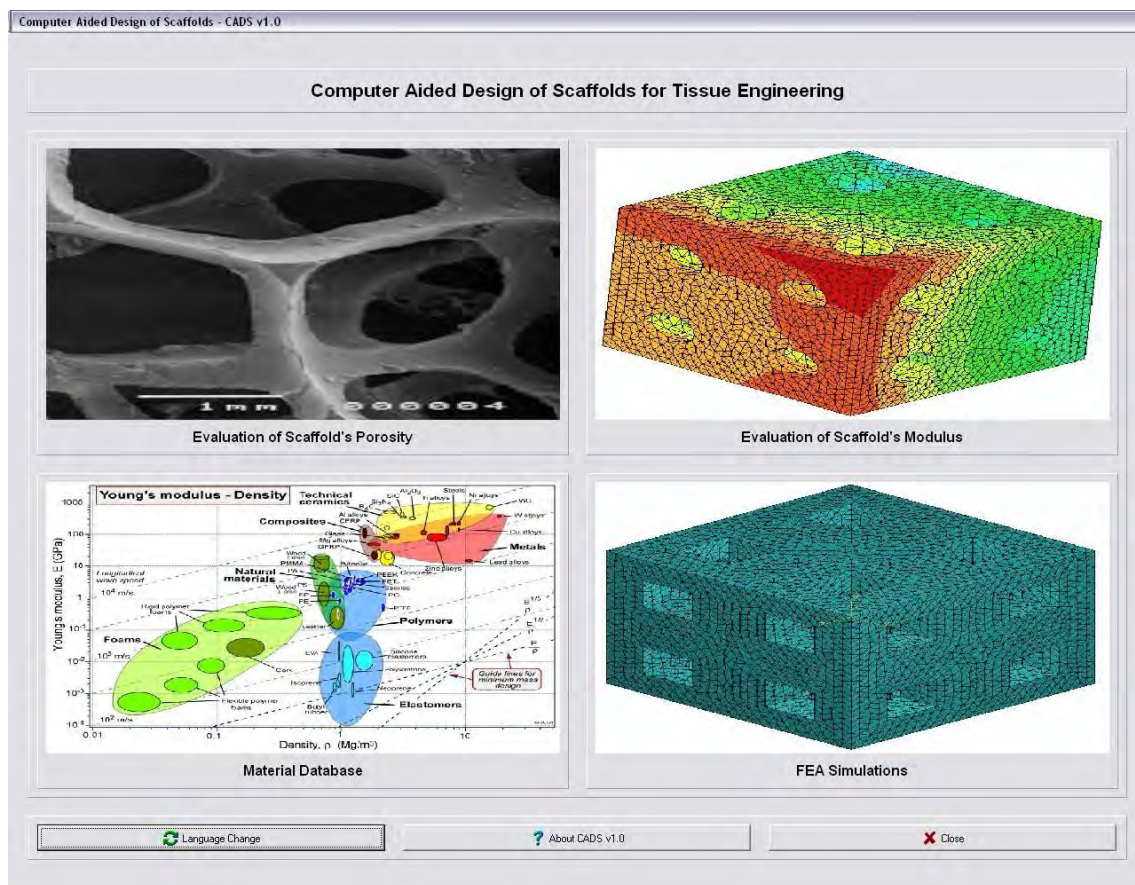


**Figura 4.7:** Ilustração esquemática do processo de produção de *scaffolds* utilizando a plataforma de gestão de informação associada à BioCell Printing.

A primeira etapa consiste na criação de um projecto. Nesta etapa, o médico responsável pelo projecto introduz os ficheiros imagiológicos no sistema, define as tarefas desejadas e coloca informação importante para a realização do projecto, tal como o prazos desejados, materiais pretendidos, etc. De seguida (fase 2) é efectuado o tratamento e segmentação da imagem médica de modo a extrair a informação relevante e gerar as superfícies e os sólidos necessários à execução das fases seguintes. Para implementação desta funcionalidade, o sistema de gestão de informação e controlo da BioCell Printing utiliza o *software* comercial Mimics (Materialise, Bélgica). Após a sua criação o biomodelo é exportado em formato STL. Na terceira fase, caso se justifique, pode ser efectuada a modelação tridimensional dos implantes a serem utilizados e realizadas operações de modificação geométrica dos mesmos. Para tal, o sistema utiliza o *software* de modelação CAD Unigraphics NX (Siemens PLM Software, Alemanha). A quarta fase consiste na análise estrutural dos *scaffold* a produzir. Para tal foi desenvolvida no Centro para o Desenvolvimento Rápido

## Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing

e Sustentado de Produto do Instituto Politécnico de Leiria uma ferramenta computacional denominada CADs (*Computer Aided Design of Scaffolds*) utilizando a linguagem Delphi (Figura 4.8). Esta é uma ferramenta computacional que faz a ponte entre várias outras aplicações informáticas, ao relacionar sistemas de modelação 3D, bases de dados e simulações numéricas.



**Figura 4.8:** Janela principal do software de *Computer Aided design of Scaffolds* (CADs) [347-348].



## Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing

O software compreende quatro módulos fundamentais:

- Módulo 1: *Evaluation of Scaffold's Porosity*;
- Módulo 2: *Evaluation of Scaffold's Modulus*;
- Módulo 3: *Material Database*;
- Módulo 4: *FEA Simulations*;

O Módulo 1 e o Módulo 2 permitem determinar a porosidade da estrutura em função do módulo elástico e o módulo elástico em função da porosidade, respectivamente. Ambos os valores (porosidade e módulo elástico) são determinados para um dado material e uma dada configuração de unidade elementar constituinte do *scaffold*. Deste modo, um *scaffold* é entendido como uma estrutura tipo *Lego* e, como tal, formado pela associação de pequenas unidades elementares.

Os Módulos 3 e 4 do software *CADS* permitem, no primeiro caso, o acesso à base de dados de materiais e a sua respectiva actualização enquanto no segundo caso podem ser realizadas simulações computacionais para unidades elementares com variação das dimensões. Com a utilização desta ferramenta, e possuindo na sua base de dados diferentes unidades elementares com diferentes topologias de poros, materiais e níveis de porosidade, é possível prever o comportamento mecânico (Módulo de Elasticidade Longitudinal e Transversal) de *scaffolds* quando sujeitos a diferentes estímulos provenientes do ambiente biomecânico nativo (tensões de compressão, tracção, corte, etc).

Na fase cinco são efectuadas as operações de fatiamento e definição de estratégias de deposição com recurso a uma ferramenta denominada *CAMOS (Computer Aided Manufacturing of Scaffolds)* tal como se detalha na secção 4.3.2. Após o processamento da informação é enviado um ficheiro (código G) para a BioCell Printing contendo toda a informação necessária para a reprodução física do modelo.

### 4.3 – Sistema de fabricação aditiva (Zona 1)

Tal como mencionado anteriormente, um dos principais objectivos deste trabalho de investigação passou pelo design e concepção de um sistema de fabricação aditiva multimaterial para posterior incorporação e sincronização com todo o sistema BioCell Printing. A estratégia de trabalho passou por uma intervenção a dois níveis nomeadamente, desenvolvimento do hardware do sistema de extrusão e concepção de software de controlo. O sistema de fabricação seleccionado para implementar no sistema BioCell Printing é baseado na extrusão de materiais termoplásticos através da utilização de um fuso accionado por um motor DC (DC, do inglês *Direct Current*). Esta escolha prende-se com o facto de existir no Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado de Produto do Instituto Politécnico de Leiria um forte conhecimento ao nível dos sistemas de bioextrusão, bem como com a necessidade de processar materiais altamente viscosos, como é o caso dos compósitos polímero/cerâmico considerados neste trabalho de investigação [349]. Por outro lado, os sistemas baseados na extrusão são relativamente económicos, de simples operação, elevada precisão e reprodutibilidade.

Nesta secção são apresentadas e devidamente justificadas as opções tomadas ao nível do desenvolvimento do hardware e software da zona de construção do sistema de biofabricação proposto.

#### 4.3.1 – Hardware

A zona de produção de *scaffolds* (zona 1) é constituída por uma plataforma de deposição e um sistema de extrusão multi-material. O sistema de extrusão representa o elemento central da zona de produção. O seu *design* e concepção foram efectuados de modo a permitir a produção de *scaffolds* multimaterial utilizando materiais altamente viscosos, aplicando diferentes estratégias de deposição, diferentes diâmetros de filamentos, diferentes níveis de porosidade e garantindo 100% de interconectividade dos canais internos dos *scaffolds*. Adicionalmente, a colocação de duas extrusoras poderá também permitir a deposição de materiais de suporte às estruturas a construir e que poderão ser removidos à *posteriori*. Os principais parâmetros de *design*, processo e do sistema que podem ser manipulados através do

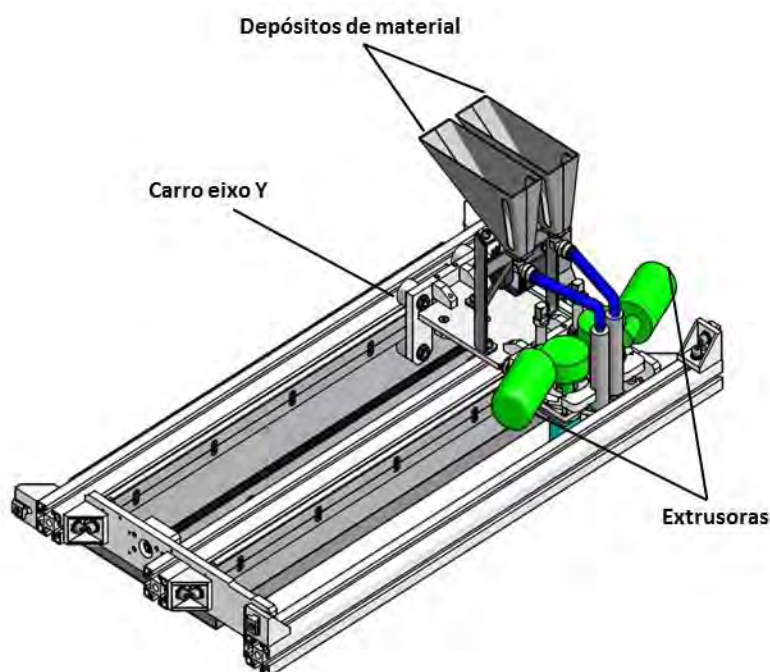
*Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing*

software de controlo da BioCell Printing (ver secção 4.3.2) ou directamente no sistema são indicados na Tabela 4.1.

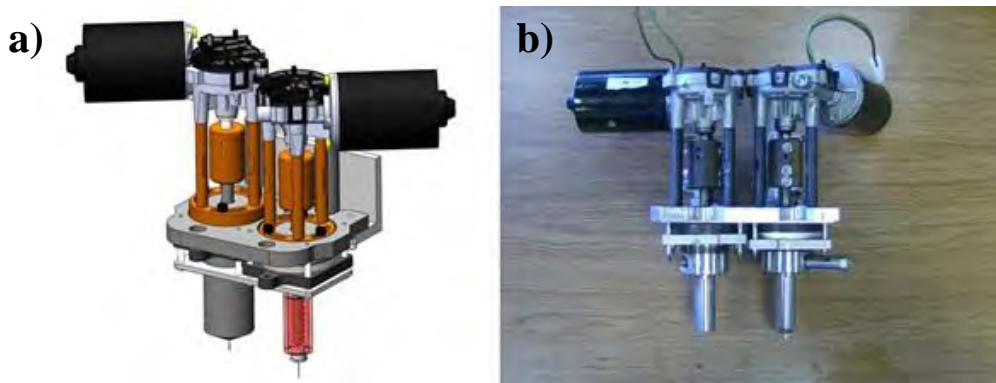
**Tabela 4.1:** Parâmetros de processo, sistema e design.

<b>Parâmetros de Processo</b>	<b>Parâmetros do Sistema</b>	<b>Parâmetros de design</b>
Velocidade de deposição	Temperatura	Distância entre filamentos
Espessura das camadas	Velocidade rotação	Ângulos de deposição
	Diâmetro do <i>nozzle</i>	

O sistema de extrusão é constituído por duas cabeças de extrusão acopladas a um carro eixo que se desloca segundo o eixo y (Figuras 4.9 e 4.10). O accionamento do carro eixo é efectuado por intermédio de um sistema constituído por porcas de esferas (Ref.: RNCT 1003A3.5, NSK, Japão) e fuso de esferas (Ref.: RS 1003A L777, NSK, Japão) ligado a um motor de passo (Ref.: 5718M-05, Lin Engineering, E.U.A) (Ver Anexo A.1).

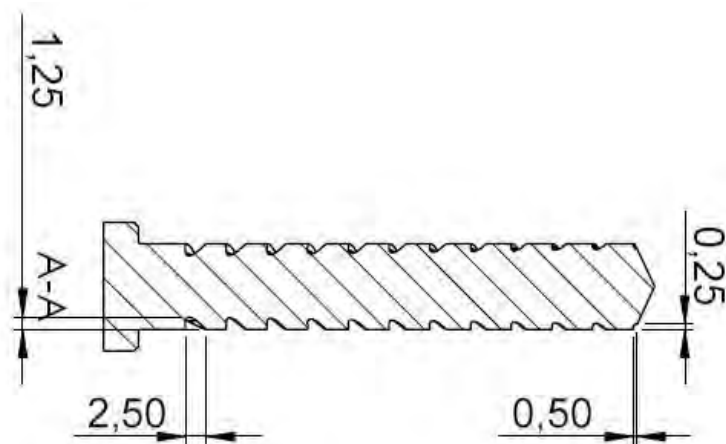


**Figura 4.9:** Ilustração do carro e sistema de suporte das extrusoras.



**Figura 4.10:** Sistema de extrusão multi-material composto por duas cabeças de extrusão. a) modelo CAD 3D; b) modelo físico.

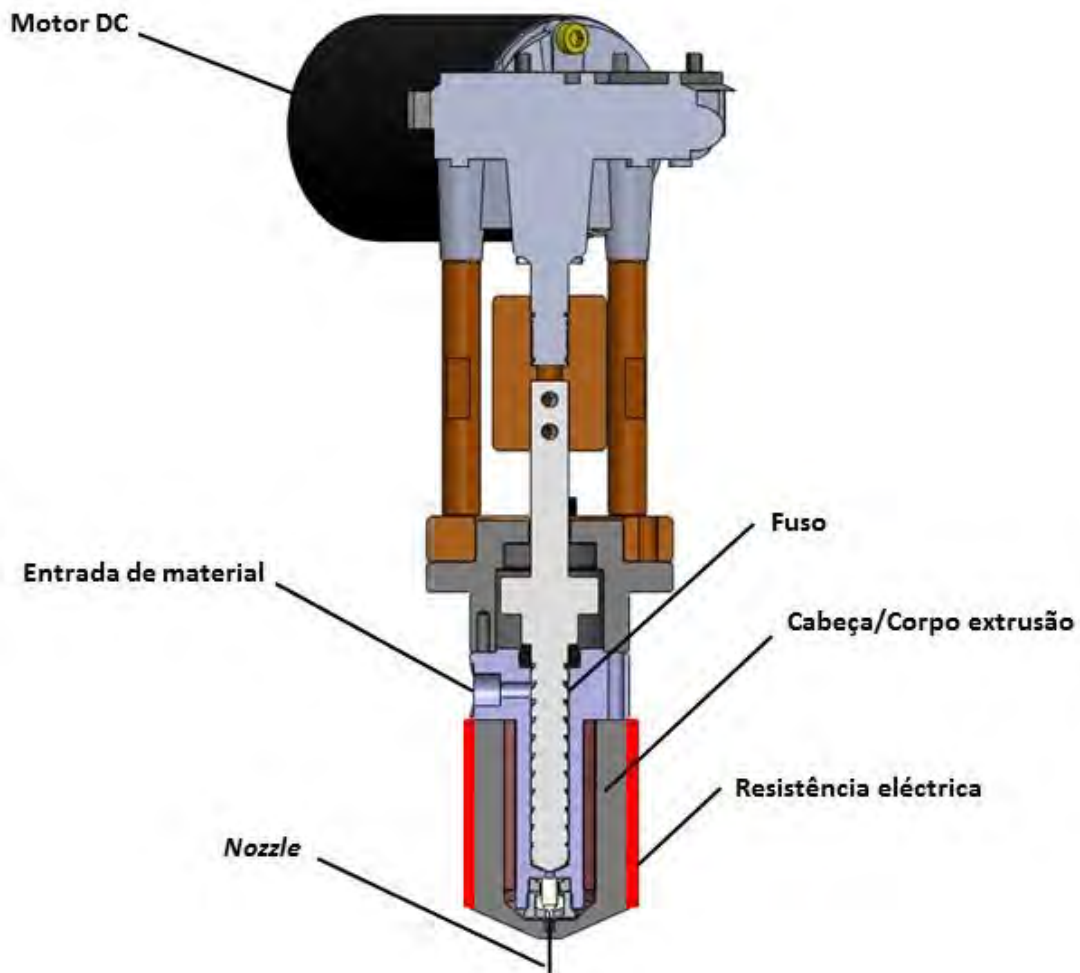
Acoplado às cabeças de extrusão encontram-se dois depósitos independentes de material, revestidos por resistências eléctricas helicoidais. Os depósitos em alumínio apresentam um volume de 25 mL. A transferência do material fundido entre os depósitos e a cabeça de extrusão é efectuada por ar comprimido. Na base do corpo de extrusão, no qual está inserido o fuso, encontra-se um *nozzle* que pode facilmente ser substituído de acordo com as dimensões dos filamentos a produzir. O fuso foi produzido em aço inoxidável e posteriormente nitrurado (para reduzir o desgaste) e apresenta um comprimento de 60,33 mm, diâmetro de 10 mm, passo 5 mm e filete de 2,5 mm tal como se indica na Figura 4.11.



**Figura 4.11:** Representação esquemática da secção transversal do fuso do sistema de extrusão. Todas as medidas estão reportadas em milímetros.

*Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing*

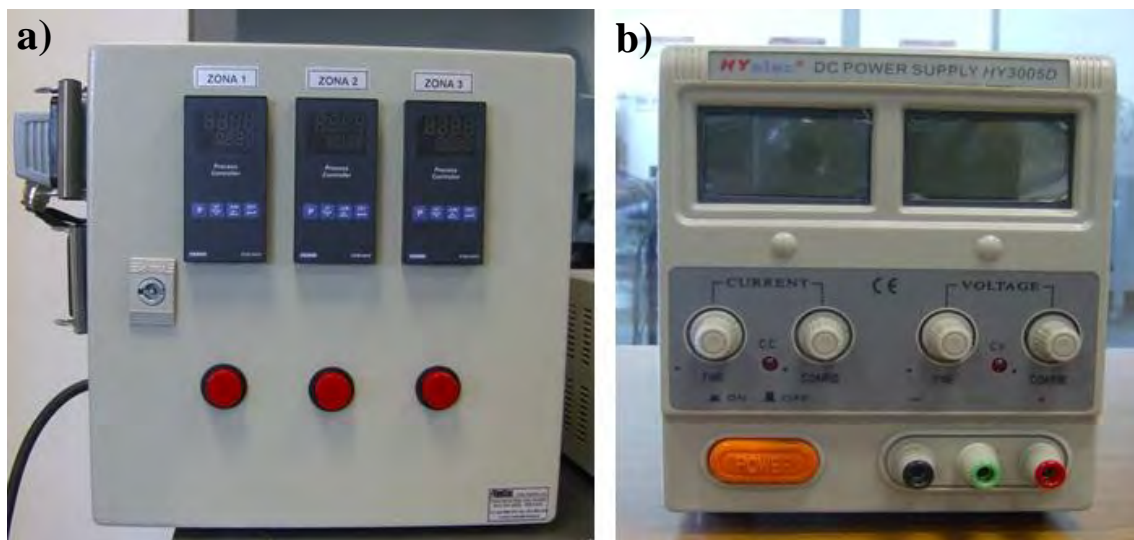
O accionamento do fuso é realizado através de um motor Bosh DC com uma velocidade máxima de rotação de 90 rpm a 24 Volts. A opção de utilizar um fuso relativamente curto para auxiliar o processo de extrusão, baseou-se na necessidade de extrudir com elevada precisão e velocidade materiais termoplásticos e compósitos altamente viscosos. Relativamente aos *nozzles*, e por uma questão económica e de esterilidade, optou-se por utilizar bicos de seringa com diâmetro variável (entre 0,1 mm e 1 mm) (Ref.: 561126, Silgal, Portugal). A fixação dos *nozzles* ao corpo de extrusão é efectuada através de um sistema roscado especialmente desenvolvido para esta aplicação (Figura 4.12).



**Figura 4.12:** Ilustração detalhada do sistema de extrusão.

#### Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing

O controlo do motor de accionamento do fuso é efectuado por intermédio de uma fonte de alimentação (Ref.: HY3005D, Hangzhou Huayi Electronics Industry Co., Ltd., China) (Ver Anexo A.1). Através da variação da voltagem é possível controlar a velocidade de rotação do fuso e deste modo promover um aumento/diminuição do fluxo de material extrudido. O sistema possui ainda um controlador de temperatura de 3 zonas equipado com um sistema PID (PID, do inglês *Proportional–Integral–Derivative controller*) por cada zona. Deste modo é possível controlar com elevada precisão a temperatura nos depósitos de material, corpo de extrusão e plataforma, reduzindo os tempos de arranque do equipamento e garantindo uma temperatura constante ao longo do processo produtivo (Figura 4.13).

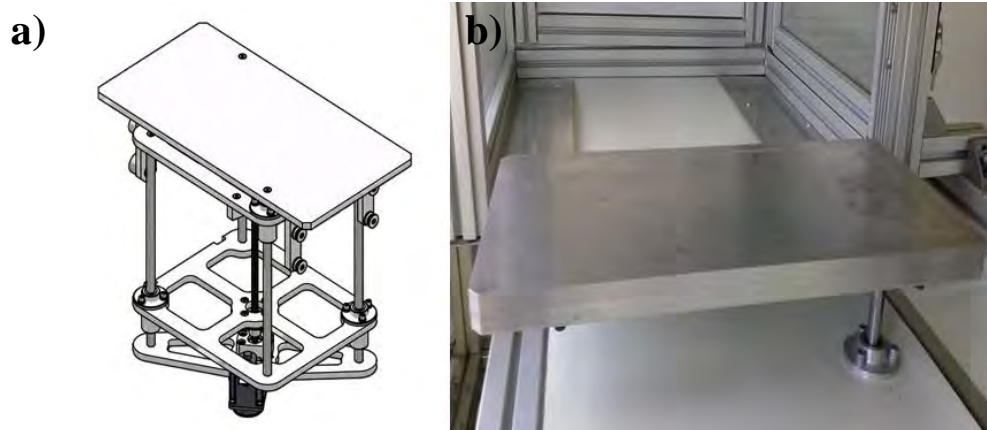


**Figura 4.13:** Controlador de temperatura de 3 zonas (a) e fonte de alimentação (b).

A deposição do material fundido e conseqüente produção dos *scaffolds* é efectuada numa plataforma móvel projectada e construída em alumínio (Figura 4.14), accionada por intermédio de um motor de passo (Ref.: 5718M-05, Lin Eengineering E.U.A) ligado a um sistema constituido por porcas de esferas (Ref.:RNCT 1003A3.5, NSK, Japão) e fuso de esferas (Ref.:rs1404A L1000, NSK, Japão) (Ver Anexo A.1). A plataforma movimenta-se segundo o eixo x e z e é guiada através de duas guias lineares de esferas colocadas em posição diagonalmente oposta (Ref.: W14 (2xL392), INA, Alemanha) (Ver Anexo A.1). A opção de colocar o movimento em x na plataforma e em y na cabeça de

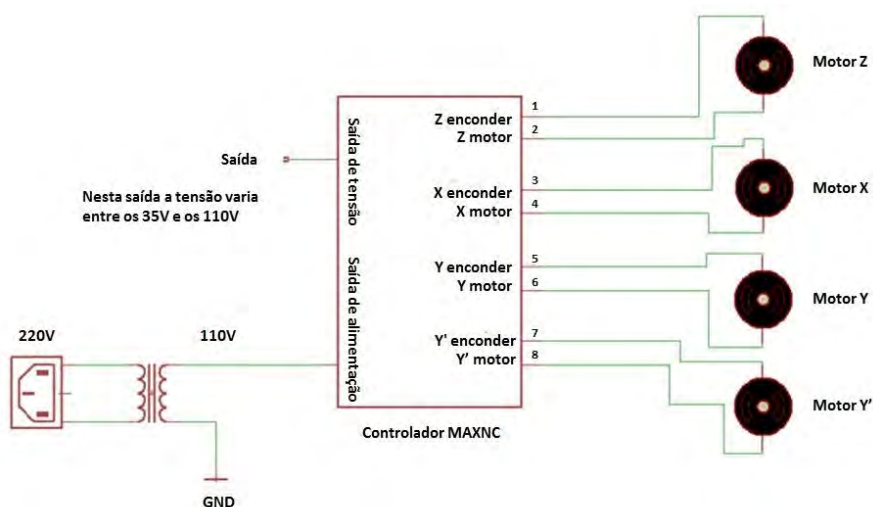
## Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing

extrusão prende-se com a necessidade de a plataforma se deslocar entre as diferentes zonas da BioCell Printing (sempre ao longo do eixo x).



**Figura 4.14:** Plataforma móvel de construção. a) modelo CAD; b) modelo real.

O accionamento dos motores de passo responsáveis pela movimentação da plataforma de construção e sistema de extrusão é efectuado através de um controlador MAXNC (Figura 4.15). Tal como se encontra representado na Figura 4.15, este sistema permite controlar de forma precisa os motores associados aos eixos x, y e z da zona de produção, bem como o movimento do dispositivo de deposição celular ao longo do eixo y (Y').



**Figura 4.15:** Esquema de funcionamento do controlador MAXNC.



### 4.3.2 – Software

A zona de produção de *scaffolds* (zona 1) da BioCell Printing é constituída por um sistema de fabricação aditiva (extrusão) baseado no princípio de construção camada a camada. Este tipo de sistemas requerem a conversão de ficheiros STL (descrevendo uma peça com uma determinada geometria) numa sequência de instruções a serem enviadas à máquina para reprodução física da peça em causa. Deste modo foi desenvolvida uma ferramenta informática específica em Matlab (MathWorks, USA) para leitura e processamento de ficheiros STL para a BioCell Printing. Esta ferramenta denominada CAMOS possui um interface que permite ao operador, de forma simples, executar diversas operações nomeadamente, a abertura do ficheiro STL, fatiamento do ficheiro STL, definição das trajetórias de deposição, manipulação de parâmetros de processo e criação do ficheiro de processamento (Figura 4.16).

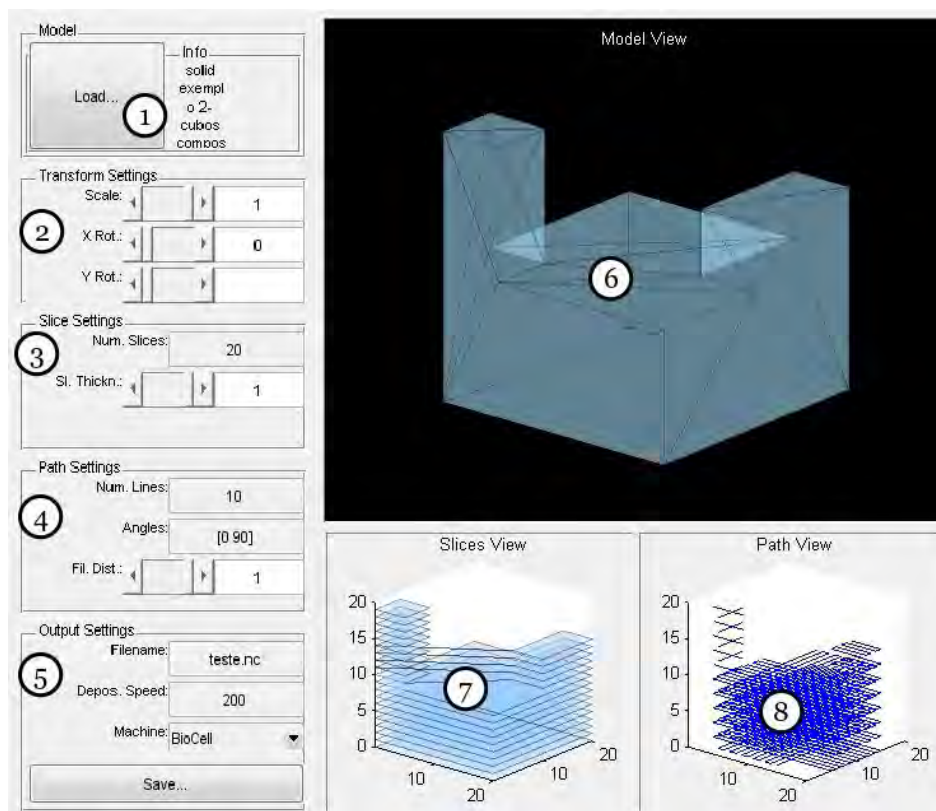


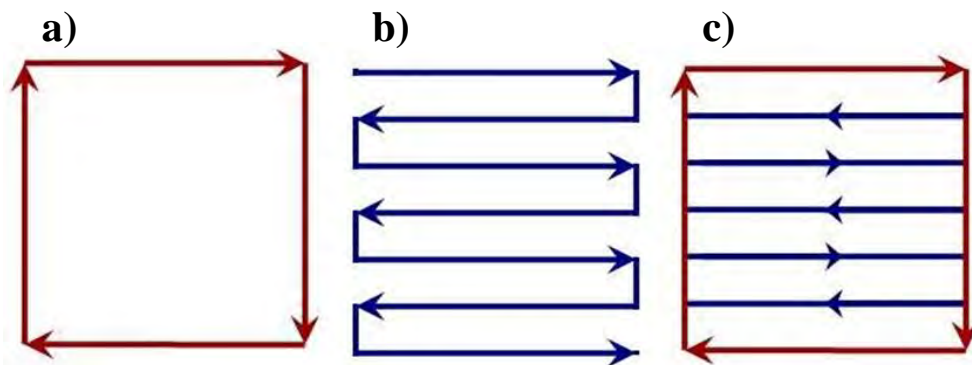
Figura 4.16: Interface do software de controlo CAMOS.



O interface da aplicação compreende 3 áreas de visualização (áreas 6, 7 e 8 na Figura 4.16) e um painel contendo diversos grupos de controlos (áreas 1, 2, 3, 4 e 5 na Figura 4.16). As três áreas de visualização, nomeadamente *Model view*, *Slice view* e *Path view*, podem ser rodadas clicando e arrastando o rato, mantendo-as sempre sincronizadas.

A utilização do software CAMOS compreende a leitura (*upload*) do modelo 3D em formato STL. Para tal deve seleccionar-se o ficheiro através da opção *Load* que se encontra no painel *Model*. O modelo seleccionado é então apresentado no painel de visualização *Model view* e as informações contidas no ficheiro são descritas na caixa *info*. Após leitura do ficheiro STL, é possível realizarem-se várias operações sobre o modelo através do painel de controlo *Transform settings* (área 2 na Figura 4.16), nomeadamente alterações de orientação (*X Rot* e *Y Rot*) e escala da peça (*Scale*). Em seguida procede-se ao fatiamento do modelo recorrendo ao painel *Slice settings*. Esta operação é realizada através da definição do número de camadas (*Num. Slices*) ou do espaçamento entre camadas que constituem a peça (*Sl. Thickn.*). O modelo fatiado pode ser observado no painel de visualização, *Slice view* (área 7 na Figura 4.16).

A definição da estratégia de deposição para cada uma das camadas a construir é efectuada através do painel de controlo *Path Settings*. Para tal foram desenvolvidas três diferentes estratégias de deposição (contorno, varrimento e contorno mais varrimento) tal como se indica Figura 4.17.



**Figura 4.17:** Diferentes estratégias de varrimento. a) contorno; b) varrimento; c) contorno e varrimento.

#### *Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing*

Para cada camada, é ainda possível definir-se o número máximo de linhas (*Num. Slices*), os ângulos de deposição (*Angles* – expresso em graus e na forma de um vector) e o espaçamento entre linhas (*Fil. Dist.*). Dependendo do número de ângulos de deposição, poderá haver necessidade de se proceder a alguns ajustamentos finais ao número de linhas de modo que a peça seja completamente preenchida por filamentos. A manipulação destes parâmetros permite modelar as propriedades mecânicas, morfológicas e biológicas das estruturas. É de realçar que a distância entre linhas de varrimento corresponde na realidade à distância entre centros de filamentos a extrudir. Variando o ângulo de deposição e a distância entre linhas é possível variar a geometria e a dimensão dos poros das estruturas, respectivamente. A velocidade de deposição deve ser igualmente ajustada com a velocidade de rotação do fuso de modo a obter filamentos com diâmetro equivalente ao do *nozzle* utilizado.

Uma vez definidos os parâmetros de operação é gerado um ficheiro em código “G” contendo toda a informação previamente definida e necessária para a reprodução física do modelo através da BioCell Printing. A configuração do ficheiro de fabricação é efectuada no painel *Output Settings*, podendo ter diferentes extensões em função da máquina (.prn ou .nc). O utilizador deverá indicar o nome do ficheiro a gerar utilizando a opção *Filename*, definir a velocidade de deposição pretendida (*Depos. Speed*) e seleccionar a opção *Save* para guardar a informação fornecida. O ficheiro pode então ser exportado para o *software* de programação do controlador MAXNC (Figura 4.18).

Este *software* permite fazer a leitura do código “G” gerado através do CAMOS, visualizar/editar o código de fabricação e enviar as instruções de produção para o sistema BioCell Printing através de uma porta paralela do computador. Adicionalmente é ainda possível uma pré-visualização do processo de deposição, movimentar manualmente os eixos, estabelecer o zero de cada eixo, definir o sistema de unidades, entre outras opções.

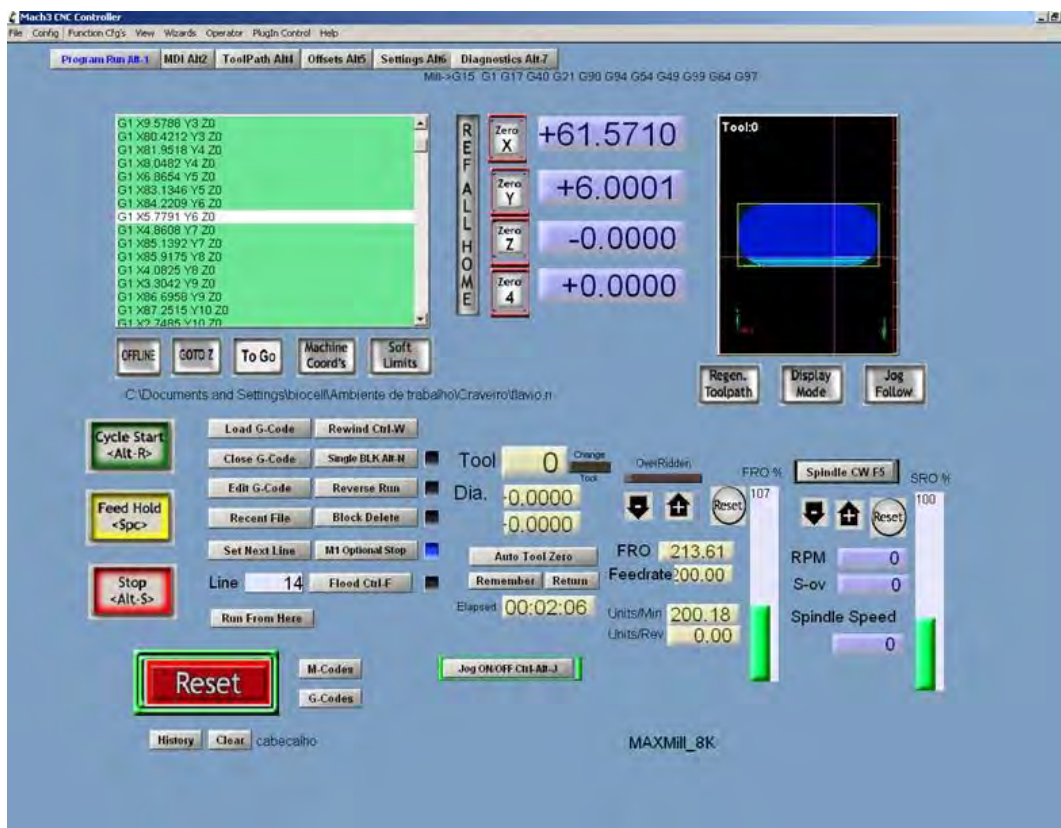


Figura 4.18: Software de programação do controlador – Mach3.

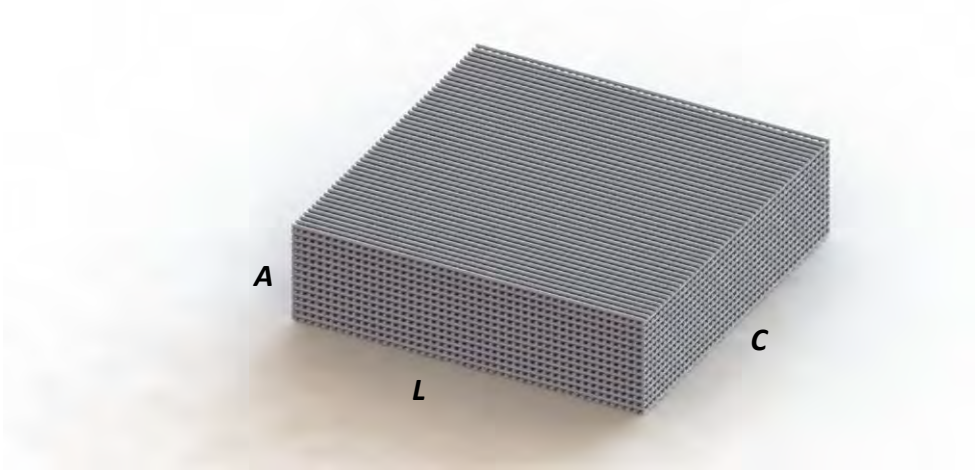
### 4.3.3 – Validação

A validação do sistema de fabricação aditiva que constitui a zona 1 do sistema BioCell Printing incidiu essencialmente na produção e consequente análise morfológica de diferentes matrizes de suporte. A primeira fase consistiu na avaliação da capacidade do sistema em reproduzir fisicamente estruturas porosas com formas geométricas relativamente simples. Para tal foram produzidos *scaffolds* quadrados, em PCL, com dimensões de 30 mm (largura) x 30 mm (comprimento) x 8mm (altura) (Figura 4.19). Os parâmetros considerados para a produção de tais estruturas estão indicados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Condições de processamento utilizadas na produção de *scaffolds* em PCL.

Condições de Processamento	
Temperatura do depósito de material	80 °C
Pressão do depósito de material	5 bar
Velocidade de rotação do fuso	30 rpm
Temperatura do corpo de extrusão	80 °C
Diâmetro do <i>nozzle</i> de extrusão	0.30 mm
Velocidade de deposição	10 mm/s
Distância entre filamentos	0.650 mm
Ângulos de deposição	0/90°
Incremento em z	0.28 mm

Os parâmetros indicados na Tabela 4.2 foram seleccionados após um trabalho prévio de avaliação de janelas de processamento de estruturas em PCL [20]. No entanto houve necessidade de efectuar pequenos ajustes, nomeadamente a nível da velocidade de rotação do fuso e velocidade de deposição, visto o sistema de extrusão apresentar características mecânicas diferentes comparativamente com a Bioextruder.



**Figura 4.19:** Modelo CAD 3D do *scaffold* utilizado na validação do sistema BioCell Printing. A, L e C representam as dimensões teóricas do *scaffolds* (A-altura, L-largura e C-comprimento).

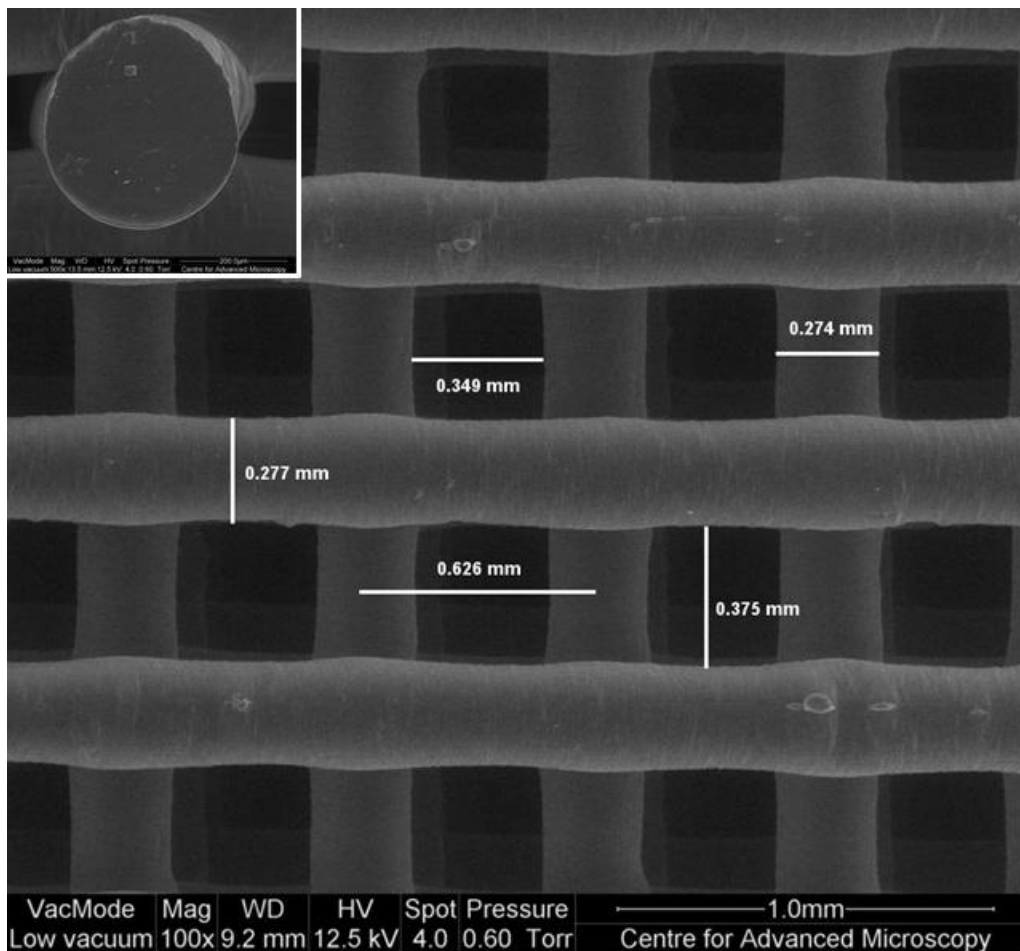
Tal como se indica na Figura 4.20, as estruturas produzidas apresentam uma geometria externa regular de forma quadrada. Ao nível macroscópico é possível observar que não

existem aglomerações de material, que os filamentos são regulares e que os *scaffolds* possuem poros quadrados com uma distribuição espacial homogênea.



**Figura 4.20:** *Scaffold* em PCL com dimensões de 30 mm x 30 mm x 8mm.

As estruturas produzidas foram igualmente analisadas do ponto de vista morfológico através de SEM com objectivo de avaliar a dimensão e geometria dos poros, diâmetro dos filamentos e adesão entre camadas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.21, sendo possível observar-se que os *scaffolds* apresentam poros de geometria quadrangular (de acordo com o ângulo de deposição definido), dimensões de  $\sim 350 \mu\text{m}$  (em concordância com a distância entre filamentos definida de  $650 \mu\text{m}$ ) e com uma distribuição espacial homogênea de poros. É ainda possível observar que os filamentos possuem uma forma circular com uma dimensão de  $\sim 300 \mu\text{m}$  de acordo com o *nozzle* utilizado. É ainda de realçar a boa adesão entre filamentos de camadas adjacentes (visível no ângulo superior esquerdo da Figura 4.21). Este factor é de extrema importância no bom comportamento mecânico das estruturas produzidas.

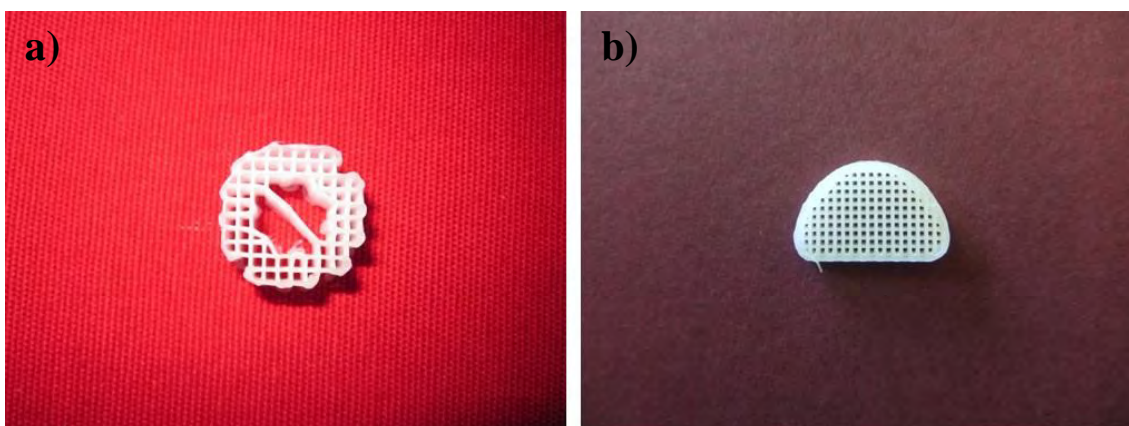


~

**Figura 4.21:** Imagem SEM de *scaffold* em PCL (vista de topo). Detalhe ilustrativo da adesão entre filamentos de camadas adjacentes (canto superior esquerdo).

Para validação da zona de construção foram ainda produzidas estruturas porosas em PCL com geometrias externas mais complexas (cilindro oco e de um disco semicircular) mantendo a mesma arquitetura interna (geometria dos poros), tal como se indica na Figura 4.22.





**Figura 4.22:** Estruturas em PCL produzidas com a BioCell Printing. a) Cilindro oco; b) disco semi-circular.

As estruturas ilustradas na Figura 4.22 foram produzidas no âmbito dos projectos de investigação em colaboração com a Universidade de Queensland e destinam-se à regeneração de defeitos ósseos a nível da tibia (Figura 4.22 a) e fusão espinal (Figura 4.22 b).

#### 4.4. Sumário

Neste capítulo foi apresentado um novo conceito, integrado e automatizado, de produção e cultura celular *in vitro* de *scaffolds* para ET, denominado BioCell Printing. Este sistema é constituído por quatro zonas distintas, onde de forma sequencial se procede à produção de *scaffolds* (zona 1), esterilização (zona 2), deposição celular (zona 3) e cultura celular (zona 4).

No âmbito deste trabalho de investigação, concebeu-se e implementou-se o sistema de fabricação que consistiu no desenvolvimento do respectivo hardware e software. A zona de construção é constituída por duas cabeças de extrusão, dois depósitos de material e uma plataforma móvel de construção. Devido à incorporação de um fuso accionado por um motor DC, é possível extrudir com elevada precisão e velocidade controlada materiais de elevada viscosidade. A possibilidade e facilidade de mudança de *nozzles* confere ao sistema uma elevada flexibilidade produtiva expressa através da extrusão de filamentos com diâmetros muito variáveis.

#### *Capítulo 4 – Desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação – Sistema BioCell Printing*

Os resultados de validação, mostram ainda que o sistema BioCell Printing permite a produção de estruturas com geometrias externas bastante diferentes e de elevada complexidade. Esta versatilidade geométrica aliada à elevada reprodutibilidade do sistema (tal como verificado através das análises morfológicas SEM) permite a produção de implantes que podem ser customizados de acordo com o defeito, local de implantação e paciente.

Com o objectivo de se validar o sistema anteriormente descrito, é efectuada no capítulo seguinte um estudo sobre o efeito das condições de processamento sobre as estruturas produzidas e avaliada o efeito da influência da geometria e dimensão dos poros no comportamento mecânico e biológico de *scaffolds* em PCL.



# Capítulo 5 – Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de *scaffolds* em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing.

---

## 5.1 – Introdução

A introdução das tecnologias de fabricação aditiva no campo da ET veio permitir a produção customizada de *scaffolds* 3D com geometrias altamente complexas, arquitecturas internas/externas reprodutíveis e, de um modo geral, 100% interconectadas. Os requisitos que os *scaffolds* devem cumprir são muito variados e incluem factores químicos, morfológicos, mecânicos e biológicos, bem como a sua variação ao longo do tempo (ver Capítulo 2). Apesar de tudo, é hoje amplamente reconhecido que a microestrutura dos *scaffolds*, mais especificamente a dimensão e geometria dos poros, desempenha um papel crucial no processo de adesão, proliferação e diferenciação celular, bem como no grau de vascularização e crescimento dos tecidos [59-63, 350-351]. A dimensão ideal dos poros pode variar de acordo com o tipo de célula ou tecido a regenerar, tal como reportado por diferentes grupos de investigação [64, 352]. No caso específico do tecido ósseo verificou-se que poros com dimensões de 100-400  $\mu\text{m}$  possuem uma elevada capacidade de osteocondução enquanto poros com dimensões superiores a 300  $\mu\text{m}$  são recomendáveis para promover a formação óssea através da vascularização. Adicionalmente, poros inferiores a 100  $\mu\text{m}$  podem não possuir dimensão suficiente para garantir um adequado transporte de massa e migração celular, induzindo deste modo a formação de tecido osteocondral [353]. A grande variabilidade de resultados obtidos e reportados na literatura, relacionados com a dimensão de poro e nível de porosidade, ideais para a regeneração de tecido ósseo, está intrinsecamente ligada aos métodos de processamento de *scaffolds* utilizados e por consequência com a incapacidade de produzir estruturas com geometrias internas/externas bem definidas

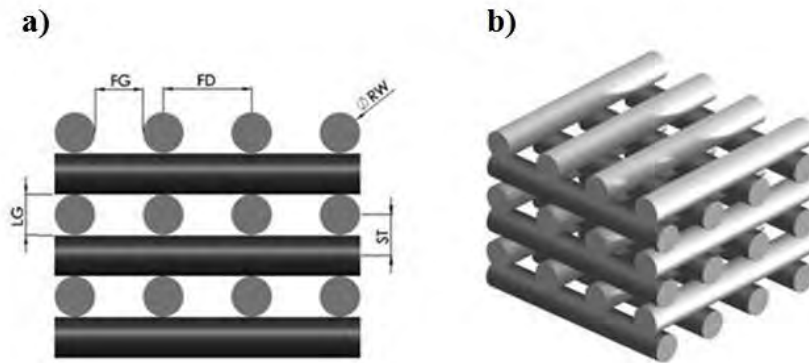
e reproduzíveis. Como tal, torna-se necessário desenvolver novas metodologias que permitam de uma forma sistemática e com elevada precisão determinar a influência destes parâmetros (dimensão/geometria de poro e porosidade) estruturais nas propriedades biomecânicas das estruturas produzidas.

O principal objectivo do presente trabalho, passa pelo estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de *scaffolds* em PCL, produzidos através de uma nova tecnologia de fabricação aditiva baseada na extrusão, denominada BioCell Printing. Os *scaffolds* com diferentes dimensões e geometrias de poros foram obtidos através da variação da distância entre filamentos e ângulos de deposição, respectivamente. As propriedades mecânicas foram determinadas através de ensaios mecânicos estáticos realizados no estado seco. As diferentes respostas biológicas dos *scaffolds* foram determinadas com recurso a células hMSC.

## **5.2 – Materiais e métodos**

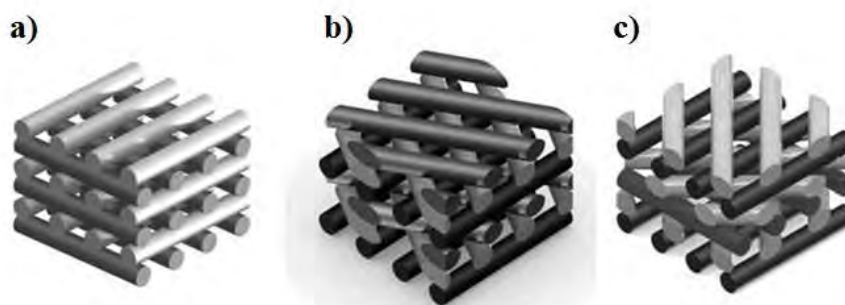
### *5.2.1 - Design e produção de scaffolds*

Para o estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de PCL produzidas no sistema BioCell Printing (Capítulo 4), foram preparadas estruturas com a configuração de prismas rectangulares com dimensões externas de 30 (comprimento) x 30 (largura) x 8 mm (altura), desenhadas no *software* SolidWorks (Dassault Systèmes, França), utilizando um *nozzle* de 300 µm. Impondo um ângulo de deposição constante de 0/90° e variando a distância entre filamentos (FD, do inglês *Filament Distance*) entre 750 µm e 550 µm, foi possível produzir *scaffolds* com poros quadrados de diferentes dimensões, níveis de porosidade e poros 100% interconectados (Figura 5.1)



**Figura 5.1:** Representação esquemática de *scaffolds* com ângulo de deposição de 0/90°. a) Vista da secção transversal com indicação dos parâmetros geométricos, nomeadamente diâmetro do filamento (RW, do inglês *Road Width*), distância entre centros de filamentos (FD, do inglês *Filament Distance*), espaçamento entre filamentos ou dimensão de poro (FG, do inglês *Filament Gap*), espaçamento entre camadas (LG, do inglês *Layer Gap*) e *slice thickness* (ST). b) Modelo CAD 3D.

Em termos de geometria de poros, foram adoptados três ângulos de deposição diferentes, 0/90°, 0/60/120° e 0/45/90/135°, mantendo um FD constante igual a 650  $\mu\text{m}$ , resultando em *scaffolds* com geometrias quadrangulares, triangulares e poligonais complexas (Figura 5.2).



**Figura 5.2:** Representação esquemática dos *scaffolds* produzidos com diferentes ângulos de deposição. a) 0/90°. b) 0/60/120°. c) 0/45/90/135°.

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

Os parâmetros operatórios utilizados na produção de todas as estruturas são indicados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1:** Parâmetros de processo e sistema utilizados para a extrusão dos *scaffolds* através da BioCell Printing. Os parâmetros representados referem-se à velocidade de deposição (DV, do inglês *Deposition Velocity*), *slice thickness* (ST), temperatura de fusão (LT, do inglês *Liquefier Temperature*), pressão de extrusão (EP, do inglês *Extrusion Pressure*) e velocidade de rotação do fuso (SRV, do inglês *Screw Rotation Velocity*).

Parâmetros de processo/sistema				
DV (mm/s)	ST ( $\mu\text{m}$ )	LT ( $^{\circ}\text{C}$ )	EP (bar)	SRV (rpm)
10	280	80	5	30

Todas as estruturas foram posteriormente cortadas em blocos de menores dimensões de acordo com as análises a realizar.

### 5.2.2 – Caracterização de scaffolds

#### **Microscopia electrónica de varrimento (SEM)**

A morfologia dos *scaffolds* foi estudada recorrendo a microscopia electrónica de varrimento (SEM, FEI Quanta 600F). De modo a avaliar a integridade macroestrutural, distribuição espacial, interconectividade e adesão entre camadas adjacentes, foram obtidas micrografias de topo e secção transversal. Optou-se igualmente por utilizar um método de operação do SEM em condições de baixo vácuo, voltagem de 12.5 kV e uma pressão de 0.6 Torr, evitando deste modo a necessidade de efectuar o revestimento dos *scaffolds* com ouro. As micrografias obtidas foram utilizadas para verificar se os valores dos parâmetros obtidos, nomeadamente o RW, FG, LG, e porosidade eram consistentes com os valores teóricos pré-definidos (ver Tabela 5.2).

**Tabela 5.2:** Valores teóricos pré-definidos para a construção dos *scaffolds*.

Ângulo Deposição (°)	FD (µm)	RW (µm)	FG (µm)	LG (µm)	Porosidade (%)
	750	300	450	280	64
0/90°	650	300	350	280	61
	550	300	250	280	58
0/60/120°	650	300	350	280	61
0/45/90/135°	650	300	350	280	61

### **Porosidade**

Os valores de porosidade teórica, apresentados na Tabela 5.2, foram retirados directamente do SolidWorks (Dassault Systèmes, França). A porosidade das estruturas produzidas foi avaliada através da seguinte metodologia:

- (1) Medição da massa e volume de cada amostra,
- (2) Cálculo da densidade aparente dos *scaffolds* de PCL,
- (3) Aplicação da seguinte equação matemática:

$$Porosidade = \left(1 - \frac{\rho^*}{\rho_{Sub}}\right) \times 100 \quad (5.1)$$

onde  $\rho^*$  representa a densidade aparente da estrutura celular (*scaffold*) e  $\rho_{sub}$  corresponde à densidade do material original ( $\rho_{sub}=1.145\text{g/cm}^3$ ). Para cada morfologia de *scaffold* foram medidas 5 amostras.

### **Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)**

A análise calorimétrica dos materiais, pré e pós processamento, foi efectuada com recurso a calorimetria diferencial de varrimento (DSC Q2000, TA Instruments) com o objectivo de determinar possíveis variações nas propriedades térmicas do material, induzidas pelo método de processamento (extrusão). Todas as amostras foram

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

pesadas (2-3 mg), colocadas em cápsulas de alumínio e devidamente seladas. As análises foram realizadas em atmosfera controlada, contendo nitrogénio (fluxo de nitrogénio de 50 mL/min). As amostras foram submetidas a um primeiro aquecimento desde 20°C até 110°C, a uma taxa de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup>, sendo de seguida arrefecidas até 20°C com uma taxa de arrefecimento de 5°C min<sup>-1</sup>. O segundo aquecimento foi efectuado desde 20°C até 110°C a uma taxa de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup>. As temperaturas de fusão ( $T_f$ ) foram determinadas a partir dos picos das curvas endotérmicas de fusão. Por sua vez, as entalpias de fusão ( $\Delta H_f$ ) foram obtidas directamente a partir das áreas abaixo dos picos. Todos os valores foram retirados a partir das curvas relativas ao segundo aquecimento. O equipamento foi previamente calibrado com um padrão de Índio.

***Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)***

As possíveis variações ao nível do peso molecular e índice de polidispersividade das amostras de PCL, induzidas pelas tensões de corte inerentes ao processo de extrusão, foram determinadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). O sistema utilizado é composto por um desgasificador e uma bomba WellChrom Maxi-Star k-1000 (Knauer), ligados a um detector LS (detector evaporativo de luz PL-EMD 960) e duas colunas (Polymer Laboratories, Mixed C 5 $\mu$ m). Todo o sistema foi mantido à temperatura ambiente. O solvente utilizado foi clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), tendo sido aplicado um fluxo de 1mL/min. As amostras (PCL granular e *scaffold* de PCL) e os padrões de PS (474; 4 290; 19 880; 30 300; 52 220; 66 350; 96 000; 200 000 Da) foram dissolvidos no solvente em proporções de 4 a 6 mg/mL.

***Análises mecânicas***

Para se determinar a influência da distância entre filamentos (FD) e ângulos de deposição sobre as propriedades mecânicas dos *scaffolds* foram realizados testes mecânicos em regime de compressão. Os *scaffolds* foram inicialmente cortados em blocos com comprimento ( $c$ ) de 5 mm, largura ( $l$ ) de 5 mm e altura ( $h$ ) de 8 mm. Todos os testes foram efectuados em *scaffolds* no estado seco a uma taxa de compressão de 1 mm/min até um valor máximo de extensão de 0,5 mm/mm, utilizando um sistema

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

INSTRON 5566 equipado com uma célula de carga de 1 kN. A tensão aparente  $\sigma$  foi determinada a partir da força  $F$  medida pela célula de carga a dividir pela área total da secção transversal aparente do *scaffold* ( $A = c \cdot l$ ):

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (5.2)$$

A extensão foi definida como o quociente entre a variação da altura do *scaffold* ( $\Delta h$ ) e a sua altura inicial ( $h_0$ )

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h_0} \quad (5.3)$$

***Análises biológicas – Adesão, proliferação e diferenciação celular***

Os testes de adesão, proliferação e diferenciação celular foram realizados utilizando células estaminais mesenquimais humanas extraídas a partir de medula óssea (hMSC, Clonetics, Itália) com o objectivo de determinar o efeito da dimensão e geometria dos poros na viabilidade, adesão, proliferação e diferenciação celular. As células, após a quarta passagem, foram colocadas em meio de cultura modificado por  $\alpha$ -Eagle ( $\alpha$ -MEM) (Bio-Whittaker, Belgica) contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 0.1 mg/ml de estreptomicina (HyClone, UK), e mantidas em atmosfera controlada a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As estruturas utilizadas para a cultura celular foram cortadas em blocos circulares para utilização em placas de cultura de 12 poços, esterilizadas numa solução de etanol/água (70% v/v) durante 24 horas, lavadas extensivamente em solução tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) 0,01 M pH 7.4, expostas a luz UV durante 40 min e por fim colocadas em meio de cultura durante 2 horas. Posteriormente, as células ( $17 \times 10^3$ ) re-suspensas em 200  $\mu$ L de meio de cultura foram depositadas directamente sobre os *scaffolds* de PCL. A adesão e proliferação celular foram avaliadas através do teste de Alamar Blue<sup>TM</sup>. Este teste baseia-se nas reacções de redução-oxidação que ocorrem na mitocôndria das células. O produto resultante desta reacção é transportado para o exterior das células (meio de cultura) onde pode ser calculado por espectrofotometria. O número de células viáveis pode ser directamente correlacionado com a magnitude de redução do

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

corante e expresso em percentagem de redução de Alamar Blue™ [354]. Para tal, em intervalos de tempo pré-determinados (7, 14 e 21 dias), os conjuntos *scaffolds*-células foram retirados das incubadoras, lavados em PBS (Sigma-Aldrich, Itália) e, para cada amostra, foram adicionados 200 µL de meio de Dulbecco / Modificado de Eagle (D-MEM) sem vermelho de fenol (HyClone, UK), contendo 10% (v/v) de Alamar Blue™ (AbD Serotec Ltd, UK). Após 4 horas de incubação em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 37°C de temperatura, foram retirados 100 µL da solução e transferidos para uma placa de 96 poços. A densidade óptica foi medida de imediato através de um espectrofotómetro (Sunrise; Tecan, Männedorf, Zurique, Suíça) utilizando comprimentos de onda de 540 e 600 nm. A expressão osteogénica das células hMSC foi avaliada através da medição da Fosfatase Alcalina (ALP, do inglês *Alkaline Phosphatase*), que é um marcador da diferenciação osteogénica inicial das células. Para tal os *scaffolds* foram depositados com uma densidade apropriada de células ( $17 \times 10^3$ ). Em intervalos de tempo pré-determinados as amostras foram retiradas da incubadora e lavadas duas vezes com PBS. De seguida os *scaffolds* foram submersos em 1 mL de solução tampão de lise celular, centrifugados, e o sobrenadante recolhido e utilizado para o cálculo da ALP através do método do p-nitrofenil fosfato (p-NPP) (Sensolyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit) (Ver Anexo A.2). A actividade da ALP foi de seguida normalizada com a quantidade de DNA, detectada e quantificada utilizando o kit Quant-iT™ PicoGreen® (Ver Anexo A.2). A morfologia celular (7, 14, e 21 dias) foi investigada com recurso a um microscópio confocal de varrimento por laser (Zeiss LSM 510/ConfoCor 2). Para tal, após a permeabilização das estruturas com Triton X-100, estas foram incubadas com uma solução de PBS 0,01 M e Faloidina durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, os *scaffolds* foram lavados com PBS, montados em lamelas de vidro para observação no microscópio. As imagens de microscopia confocal referentes a cada tipologia de amostra foram também devidamente analisadas com recurso ao software Image J de modo a determinar o factor geométrico das células (*shape factor*), definido como:



$$\Phi = \frac{\Theta A}{P^2} \quad (5.4)$$

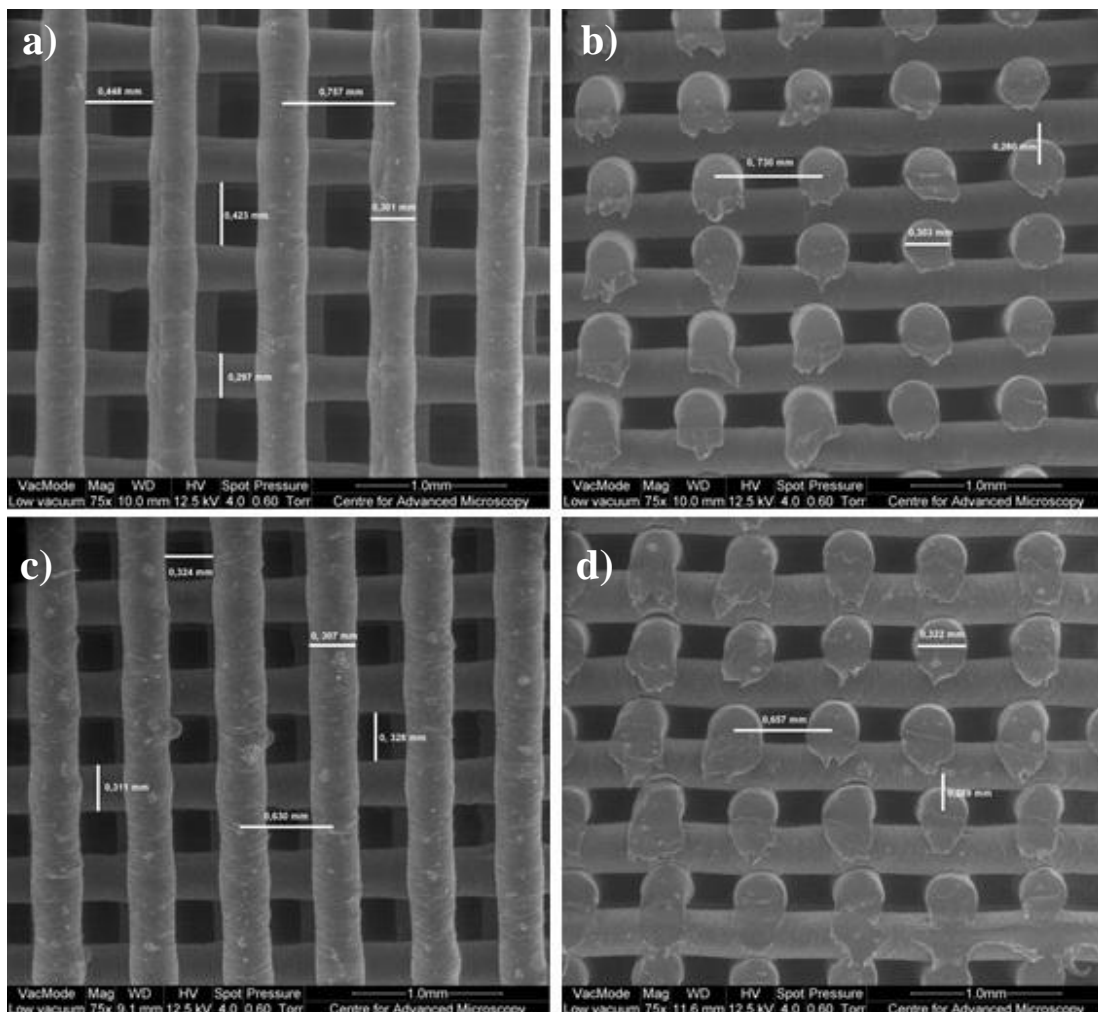
onde  $\Theta$  representa uma constante geométrica de valor igual a  $4\pi$  dado no instante inicial as células terem uma forma circular,  $A$  representa a área e  $P$  o perímetro da célula. Considerando que objectos circulares possuem um maior quociente área/perímetro, então um factor geométrico de 1 representa um círculo perfeito. Contrariamente, um objecto com aspecto filamentar apresentará um factor geométrico muito baixo, com tendência para zero [355].

### **5.3 Resultados e discussão**

A colonização de *scaffolds* e matrizes 3D dependente de vários factores nomeadamente, aspectos relacionados com a arquitectura interna das matrizes de suporte (dimensão e geometria de poros), interconectividade, porosidade e topografia superficial. É amplamente reconhecida a influência da dimensão e geometria dos poros na adesão/proliferação celular e crescimento de tecidos, tanto *in vitro* como *in vivo*. A elevada heterogeneidade dos resultados obtidos e disponíveis na literatura não possibilitam contudo retirar conclusões assertivas quanto à dimensão de poro adequada para a adesão e diferenciação de diferentes tipos de células. O presente estudo tem como objectivo demonstrar a capacidade do sistema BioCell Printing (Capítulo 4) na produção de *scaffolds* com elevada precisão geométrica e dimensional, reprodutibilidade, e estabilidade estrutural. A flexibilidade do equipamento em produzir estruturas com diferentes arquitecturas internas e níveis de porosidade, através da simples manipulação de alguns parâmetros de processo/design, é claramente evidenciada neste trabalho. O efeito destes parâmetros de design (dimensão e geometria de poro) no comportamento mecânico e biológico das estruturas é estudado e reportado. Por fim é discutido o potencial da BioCell Printing como ferramenta complementar para a produção de *scaffolds* com o objectivo de estudar de modo preciso e sistemático as interacções entre células/tecidos e *scaffolds* [58, 62, 64, 353, 356-360].

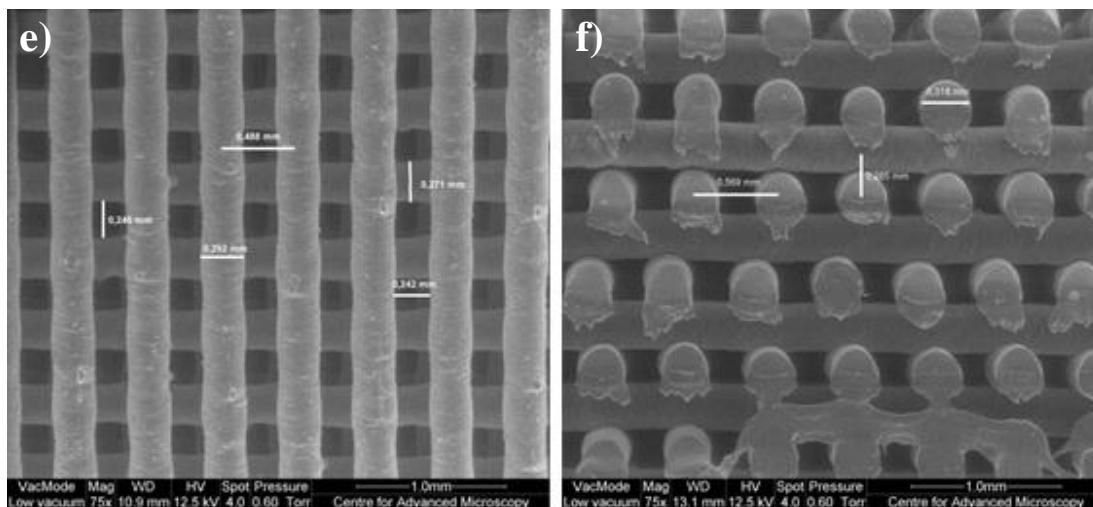
### Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

Através da variação dos parâmetros de design, nomeadamente a distância entre filamentos e o ângulo de deposição, foi possível produzir *scaffolds* com diferentes dimensões e geometrias de poro. As imagens de SEM obtidas a partir das análises efectuadas aos *scaffolds* de PCL, produzidos com um ângulo de deposição constante de 0/90° e diferentes distâncias entre filamentos (750, 650 e 550 µm), indicam-se na Figura 5.3.



**Figura 5.3:** Imagens SEM de *scaffolds* em PCL com diferentes valores de FD. a) vista de topo FD = 750 µm; b) vista secção transversal FD = 750 µm; c) vista de topo FD = 650 µm; d) vista secção transversal FD = 650 µm; e) vista de topo FD = 550 µm; f) vista secção transversal FD = 650 µm.

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*



**Figura 5.3 (continuação):** Imagens SEM de *scaffolds* em PCL com diferentes valores de FD. e) vista de topo FD = 550 µm; f) vista secção transversal FD = 650 µm.

Através da análise destas micrografias é possível verificar que os *scaffolds* possuem uma estrutura interna bem definida com poros quadrados e de dimensões variáveis entre 245 µm e 433 µm.

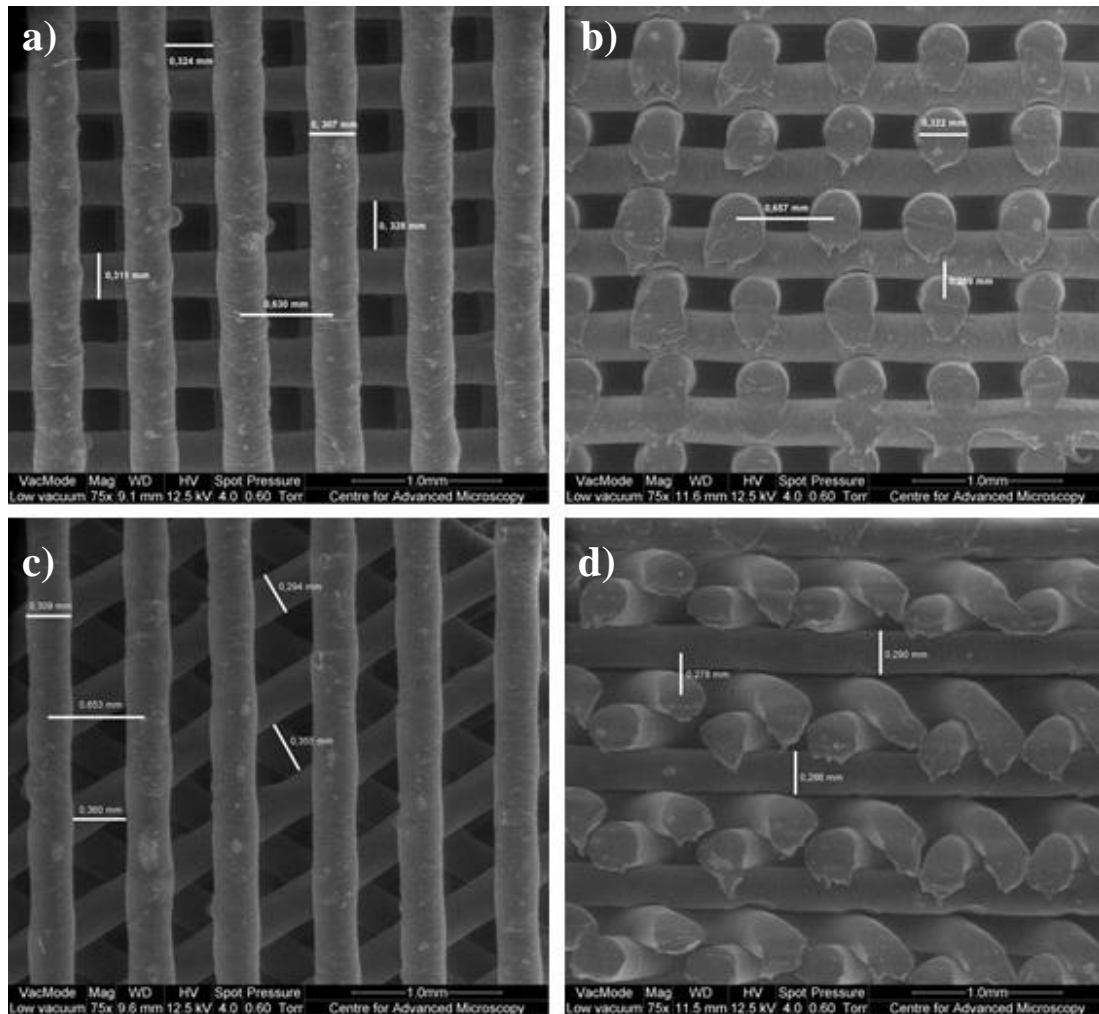
As principais características morfológicas dos *scaffolds* produzidos são indicadas na Tabela 5.3, sendo possível observar uma elevada consistência entre os valores teóricos pré-definidos e os valores experimentais obtidos para o diâmetro de filamento (RW), espaçamento entre filamentos (FG), espaçamento entre camadas (LG) e porosidade.

**Tabela 5.3:** Características morfológicas dos *scaffolds* extrudidos com ângulo de deposição 0/90° e diferentes valores de FD.

FD (µm)	RW (µm)	FG (µm)	LG (µm)	Porosidade (%)
750	300±3	433±13	225±8	57
650	313±8	333±12	249±14	55
550	294±24	245±2	261±37	49

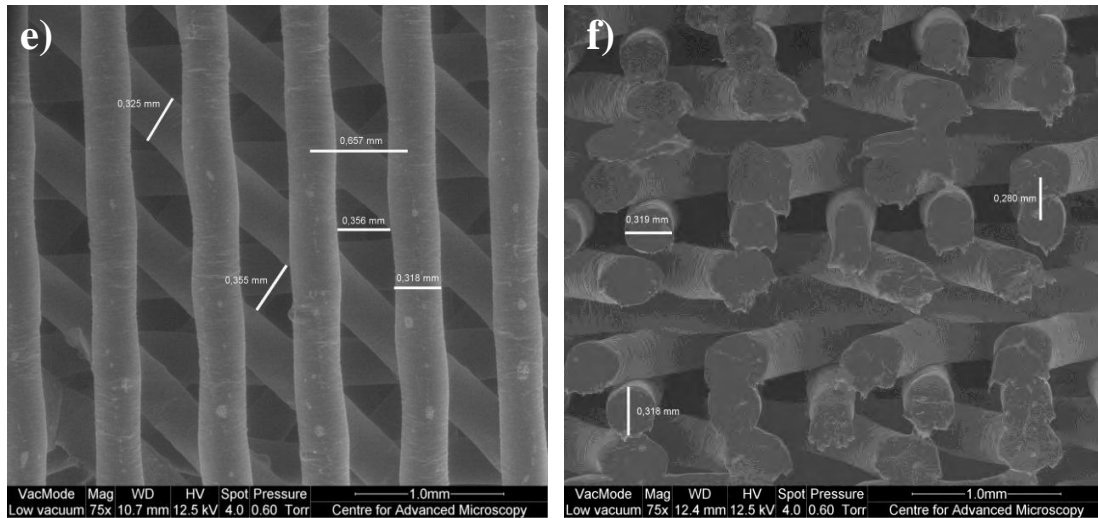
*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

Relativamente à geometria de poros, foram considerados três ângulos de deposição distintos ( $0/90^\circ$ ,  $0/60/120^\circ$  e  $0/45/90/135^\circ$ ), mantendo um FD constante de  $650\ \mu\text{m}$ , resultando em *scaffolds* com geometrias de poro quadrangular, triangular e poligonal complexa (Figura 5.4).



**Figura 5.4:** Imagens SEM de *scaffolds* em PCL com diferentes ângulos de deposição. a) vista de topo com ângulo de  $0/90^\circ$ ; b) vista secção transversal com ângulo de  $0/90^\circ$ ; c) vista de topo com ângulo de  $0/60/120^\circ$ ; d) vista secção transversal com ângulo de  $0/60/120^\circ$ .

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*



**Figura 5.4** (continuação): Imagens SEM de *scaffolds* em PCL com diferentes ângulos de deposição. e) vista de topo com ângulo de 0/45/90/135°; f) vista secção transversal com ângulo de 0/45/90/135°.

Aumentando o número de ângulos de deposição considerados na definição geométrica dos *scaffolds* de dois (0/90°) para quatro (0/45/90/135°), é possível observar-se um aumento da complexidade geométrica dos poros. Contudo, este aumento não se traduz numa variação do nível da porosidade, que se mantém constante e de valor médio de ~55% (ver Tabela 5.4)

**Tabela 5.4:** Características morfológicas dos *scaffolds* extrudidos com FD constante de 650  $\mu\text{m}$  e ângulo de deposição variável.

Ângulo Deposição (°)	RW ( $\mu\text{m}$ )	FG ( $\mu\text{m}$ )	LG ( $\mu\text{m}$ )	Porosidade (%)
0/90°	313±8	333±12	249±14	55
0/60/120°	298±10	350±13	509±13	55
0/45/90/135°	318±1	358±8	874±7	54

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

Independentemente da dimensão ou geometria dos poros, todas as estruturas apresentam uma elevada consistência geométrica e dimensional com canais internos (poros) interconectados. É ainda possível observar-se a existência de uma boa adesão entre filamentos de camadas adjacentes, o que confere às estruturas uma boa estabilidade estrutural.

**Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)**

A validação do sistema BioCell Printing, do ponto de vista térmico, foi efectuada com recurso à técnica DSC. Para tal foram analisadas as propriedades térmicas do material não-processado (material granular) e processado (*scaffold*). Os resultados encontram-se indicados na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5:** Propriedades térmicas relativas ao material (PCL) processado e não-processado. Os símbolos  $T_F$ ,  $\Delta H_F$  e  $X_C$  correspondem à temperatura de fusão, entalpia de fusão e grau de cristalinidade, respectivamente.

<b>Amostra</b>	<b><math>T_F</math> (°)</b>	<b><math>\Delta H_F</math> (J/g)</b>	<b><math>X_C</math> (%)</b>
Não-processado	58.43	82.24	59.0
Processado	59.64	82.50	59.1

A partir da Tabela 5.5, verifica-se que os valores relativos à temperatura de fusão e grau de cristalinidade não sofrem variações consideráveis. A temperatura de fusão do material processado e não-processado manteve-se praticamente inalterada com um valor aproximado de 56°C. Por sua vez os valores do grau de cristalinidade do material não-processado e processado foram de 59%. Estas observações permitem-nos concluir que o processo de extrusão, nomeadamente as temperaturas, pressões e tensões de corte envolvidas não alteram as propriedades térmicas do material. De notar que a temperatura de fusão é um parâmetro importante para a definição das condições de processamento e que a cristalinidade determina as propriedades mecânicas e a cinética de degradação. A temperatura de fusão está igualmente intimamente

associada à cristalinidade das estruturas obtidas na medida em que corresponde à temperatura que é necessário fornecer ao material para destruir as zonas cristalinas altamente ordenadas criando um fundido amorfo. Para além do fluxo que impõe uma certa orientação nas cadeias poliméricas, o mecanismo de cristalização durante o processo de extrusão depende da duração do ciclo de arrefecimento.

#### ***Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)***

A potencial degradação do material, causada pelo processo de extrusão, mais concretamente pelas tensões de corte induzidas pelo fuso, foi analisada por HPLC. Os valores relativos ao peso molecular médio (Mn) e índice de polidispersividade (Mw/Mn) dos materiais processados e não- processados encontram-se indicados na Tabela 5.1. Os resultados obtidos indicam um ligeiro aumento do peso molecular médio (Mn) e índice de polidispersividade (Mw/Mn) das amostras processadas relativamente às não-processadas. No entanto esta variação é muito ligeira e pouco significativa. Através da análise dos valores obtidos é possível concluir que o material polimérico apresenta uma elevada estabilidade quando submetido às condições de processamento indicadas na Tabela 5.6.

**Tabela 5.6:** Distribuição dos pesos moleculares das amostras processadas e não processadas.

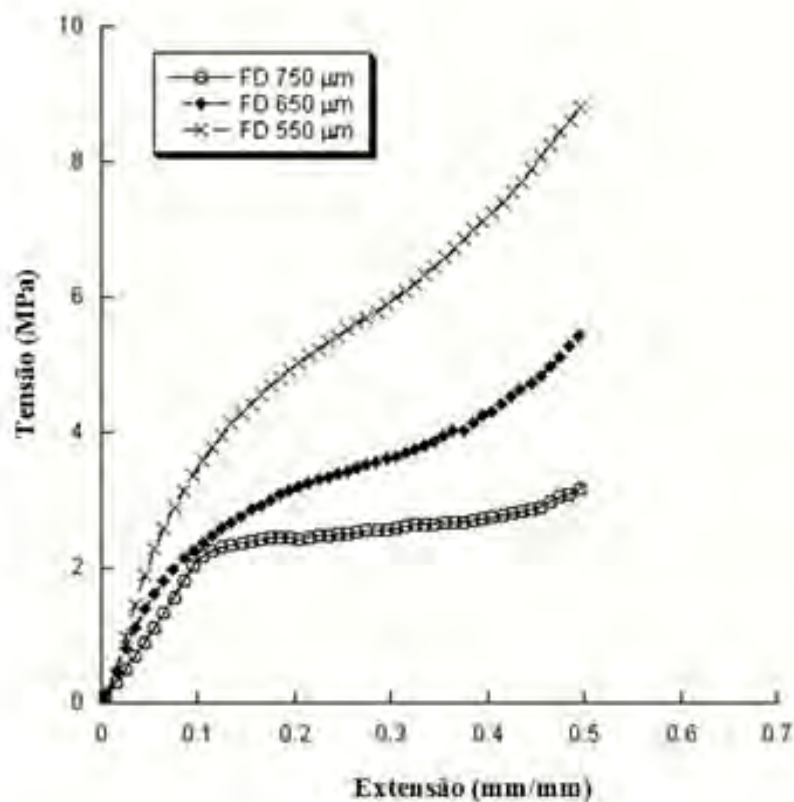
<b>Amostra</b>	<b>Mw</b>	<b>Mn</b>	<b>Mw/Mn</b>
Não-processado	115 980	89 333	1,30
Processado	117 188	89 405	1,31

#### ***Análises mecânicas***

Os testes mecânicos à compressão foram realizados em todos as tipologias de *scaffolds* com o objectivo de determinar a influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades mecânicas das estruturas. Todos os testes foram realizados no estado seco a uma taxa de compressão de 1 mm/min até uma extensão máxima de 0,5

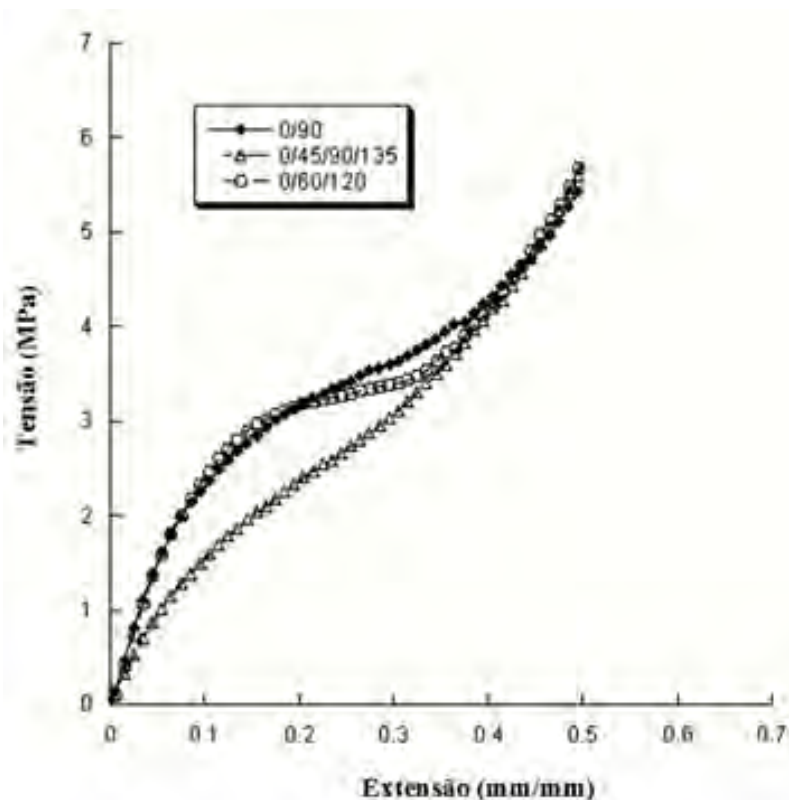
*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

mm/mm. Nas Figuras 5.5 e 5.6 encontram-se ilustradas as curvas típicas de tensão/extensão obtidas para *scaffolds* com dimensão de poro e geometria variável, respectivamente. Estas curvas demonstram o efeito destes dois parâmetros morfológicos (dimensão e geometria de poro) nas propriedades mecânicas das estruturas.



**Figura 5.5:** Efeito da variação da distância entre filamentos (FD) no comportamento mecânico dos *scaffolds* 3D. Curvas de tensão/extensão obtidas a partir da compressão de *scaffolds* produzidos com ângulo de deposição constante (0/90°) e FD variável (750 µm, 650 µm e 550 µm).





**Figura 5.6:** Efeito da variação dos ângulos de deposição no comportamento mecânico dos scaffolds 3D. Curvas de tensão/extensão obtidas a partir da compressão de scaffolds produzidos com FD constante (650  $\mu\text{m}$ ) e ângulo de deposição variável (0/90°, 0/60/120°, 0/45/90/135°).

Os resultados obtidos revelam que os scaffolds apresentam um comportamento mecânico similar ao das espumas flexíveis [361-362]. As curvas são caracterizadas por três zonas distintas: uma primeira zona linear elástica de elevada resistência mecânica, seguida por uma zona de menor resistência (domínio plástico) e finalmente por uma terceira zona de alta resistência mecânica típica do processo de densificação das espumas flexíveis [361]. Relativamente à segunda zona da curva de tensão/extensão, é possível verificar, que ao contrário das espumas flexíveis, os scaffolds 3D produzidos por extrusão não apresentam um *plateau* (declive da curva igual a zero). No entanto, esta região, tal como no caso das espumas flexíveis, continua a ser caracterizada por

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

uma resistência mecânica inferior às outras duas regiões [363]. Os valores do módulo elástico bem como da tensão máxima de compressão apresentam-se na forma de valor médio  $\pm$  desvio padrão nas Tabelas 5.7 e 5.8. De notar que o módulo elástico aparente ( $E'$ ) foi calculado com base no declive da curva da região linear elástica.

**Tabela 5.7:** Efeito da variação do FD nas propriedades mecânicas dos *scaffolds*. Ângulo de deposição constante (0/90°) e FD variável (750  $\mu$ m, 650  $\mu$ m e 550  $\mu$ m).

Distância entre filamentos FD ( $\mu$ m)	Módulo elástico aparente $E'$ (MPa)	Tensão máxima $\sigma_{max}$ (MPa)
750	23.1 $\pm$ 2.8	2.7 $\pm$ 0.5
650	34.2 $\pm$ 3.8	5.6 $\pm$ 0.2
550	52.5 $\pm$ 4.5	8.7 $\pm$ 1.2

**Tabela 5.8:** Efeito da variação do ângulo de deposição nas propriedades mecânicas dos *scaffolds*. FD constante (650  $\mu$ m) e ângulo de deposição variável (0/90°, 0/60/120°, 0/45/90/135°).

Ângulo de deposição (°)	Módulo elástico aparente $E'$ (MPa)	Tensão máxima $\sigma_{max}$ (MPa)
0/90°	34.2 $\pm$ 3.8	5.6 $\pm$ 0.2
0/60/120°	30.5 $\pm$ 4.5	5.0 $\pm$ 0.6
0/45/90/135°	19.1 $\pm$ 2.8	4.9 $\pm$ 0.3

Tal como esperado, o comportamento mecânico de *scaffolds* 3D produzidos com ângulo de deposição e parâmetros de processo constantes, é altamente afectado pela variação da distância entre filamentos (FD). À medida que o FD aumenta de 550  $\mu$ m para 750  $\mu$ m (a porosidade aumenta de 49% para 57%) o módulo elástico e a tensão máxima de compressão diminuem de 52.5  $\pm$  4.5 MPa para 23.1  $\pm$  2.8 MPa e de 8.7  $\pm$  1.2 MPa para 2.7  $\pm$  0.5 MPa, respectivamente (Tabela 5.7). Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura e confirmam a dependência directa entre a porosidade e as propriedades mecânicas [90, 361, 364]. Relativamente às estruturas produzidas com

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

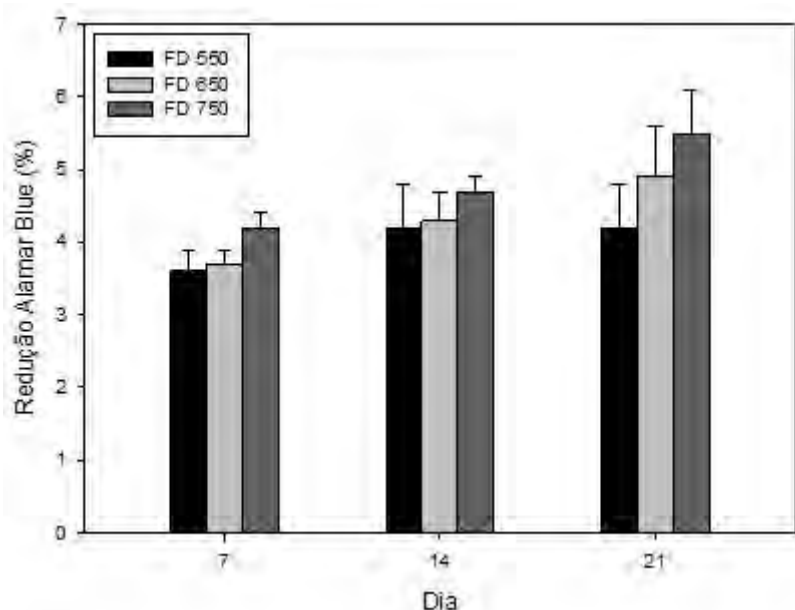
FD e parâmetros de processo constantes, foi possível observar a influência do ângulo de deposição (geometria de poro) nas propriedades mecânicas dos *scaffolds*. Tal como indicado na Tabela 5.8, os *scaffolds* produzidos com ângulo de deposição de 0/90° (2 ângulos) apresentam valores de módulo elástico aparente ( $E' = 34.2 \pm 3.8$  MPa) e tensão máxima de compressão ( $\sigma_{\max} = 5.6 \pm 0.2$  MPa) superiores aos *scaffolds* caracterizados por ângulos de deposição de 0/60/120° (3 ângulos) e 0/45/90/135° (4 ângulos). Nesta situação é possível verificar que a diminuição da amplitude dos ângulos de deposição entre filamentos de camadas adjacentes (com conseqüente aumento da área de fusão/contacto) conduziu a uma diminuição da tensão local suportada pelos *scaffolds* [90]. Como tal, quando as estruturas são solicitadas à compressão, os filamentos depositados com menor amplitude angular (0/45/90/135°) tendem a deslizar mais facilmente uns sobre os outros, aumentando substancialmente a deformabilidade global dos *scaffolds* [364]. No caso de aplicações ósseas, caracterizadas por elevados esforços mecânicos, os *scaffolds* 3D devem possuir a capacidade de resistir às tensões mecânicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, durante um determinado período de tempo, de modo a garantir uma adequada estabilidade estrutural (dimensão de poro e interconectividade) necessária para a correcta adesão, proliferação e diferenciação celular, vascularização e crescimento tecidual. Adicionalmente, os *scaffolds* devem apresentar propriedades mecânicas semelhantes às do tecido nativo (osso) de modo a evitar fenómenos de reabsorção óssea (*scaffold* com propriedades mecânicas superiores ao osso) ou até mesmo falha mecânica/estrutural da estrutura (incapacidade do *scaffold* suportar as cargas fisiológicas) [63]. Tal como reportado por Yang [65] os valores médios da tensão de compressão e módulo elástico do osso trabecular humano são 4-12 MPa e 0,02-0,5 GPa, respectivamente. A análise e comparação destes valores permitem concluir que os *scaffolds* de PCL produzidos pelo sistema BioCell Printing apresentam um enorme potencial, do ponto de vista mecânico, para aplicação em regeneração de tecido ósseo.

***Análises biológicas – Adesão, proliferação e diferenciação celular***

O principal objectivo dos *scaffolds* para ET é mimetizar o ambiente dos tecidos nativos, fornecendo estímulos químicos, físicos e biológicos adequados para a adesão, proliferação e diferenciação celular. Os requisitos dos *scaffolds*, tais como dimensão de poro, geometria e porosidade, podem variar de acordo com o tipo de célula. Deste modo é necessário que o design e a produção das estruturas seja suficientemente flexível de forma a acomodar e promover o crescimento de linhas celulares específicas [63]. Adicionalmente, o processo de colonização celular dos *scaffolds* é altamente dependente da capacidade que as células apresentam de criar pontes entre os poros e migrar para o interior do *scaffold*. Caso a dimensão dos poros não seja adequada (demasiado grande ou demasiado pequena) as células não irão apresentar a capacidade de migrar e colonizar de forma homogénea os *scaffolds*. Assim, torna-se necessário definir a dimensão (ou intervalo de dimensões) ideal para suportar a adesão e conseqüente crescimento celular [356].

Neste sentido, foram realizados testes biológicos em *scaffolds* de PCL utilizando células hMSC, com o objectivo de determinar o efeito da dimensão e geometria dos poros na adesão, proliferação, diferenciação e morfologia celular. As células ( $17 \times 10^3$  re-suspensas em 200  $\mu\text{L}$ ), independentemente da dimensão e geometria de poro, foram depositadas directamente sobre os *scaffolds* de PCL e cultivadas *in vitro* durante 21 dias. Em períodos pré-determinados de 7, 14 e 21 dias, os *scaffolds*/células foram retirados da incubadora, e os testes quantitativos de viabilidade e proliferação realizados com recurso a Alamar Blue<sup>TM</sup>. Os resultados obtidos demonstram uma clara influência da dimensão e geometria dos poros na viabilidade e proliferação celular (Figuras 5.7 e 5.8).

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*



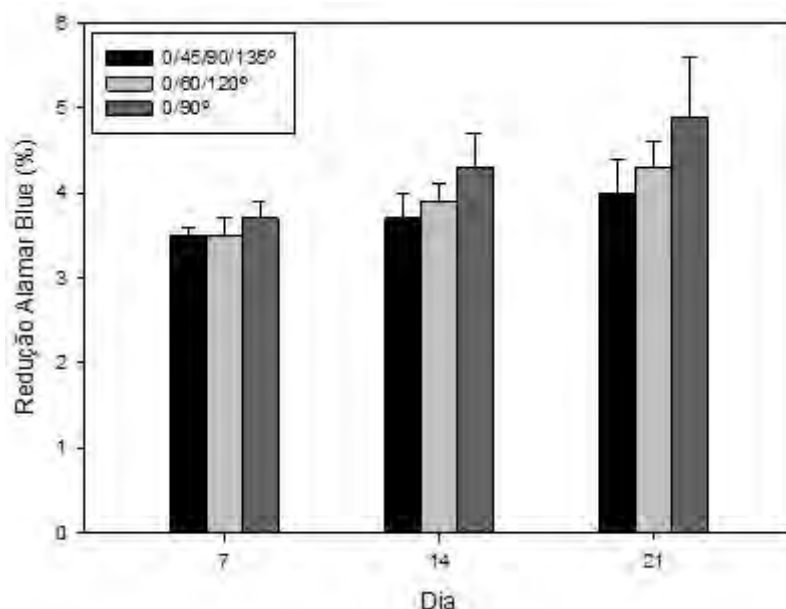
**Figura 5.7:** Percentagem de redução de Alamar Blue™ em função da dimensão de poro utilizando células hMSC.

Através da análise dos resultados apresentados na Figura 5.7 é possível verificar-se que, independentemente da dimensão dos poros, todas as estruturas revelaram boa capacidade de promover a viabilidade e proliferação celular. Esta observação é suportada pelo aumento da percentagem de redução de Alamar Blue™ ao longo do período de incubação (21 dias). Adicionalmente, os resultados sugerem um aumento do número de células vitais (relacionado com a percentagem de redução de Alamar Blue™) com o aumento da distância entre filamentos (dimensão de poro). De forma mais concreta, é possível verificar que os *scaffolds* com FD igual a 750 $\mu$ m (poro de 450  $\mu$ m) possuem um maior número de células vitais (maior adesão e proliferação celular) nos dias 7, 14 e 21, comparativamente com os *scaffolds* de menor FD (650  $\mu$ m e 550  $\mu$ m). Este facto poderá estar relacionado com a maior área superficial que os *scaffolds* com poros de dimensões superiores (maior porosidade) apresentam, e que lhes permite acomodar um maior número de células. Adicionalmente, canais com maior dimensão permitem um transporte de oxigénio e nutrientes (elementos essenciais para a vitalidade celular) muito maiores e mais eficazes. Um outro aspecto bastante

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

relevante, está relacionado com o elevado potencial de aplicação de células hMSC para regeneração de tecido ósseo, essencialmente devido à facilidade de extracção a partir da medula óssea e conseqüente expansão e diferenciação osteogénica *in vitro*. Neste contexto têm sido reportadas dimensões óptimas de poros, variando no caso da regeneração óssea entre 100  $\mu\text{m}$  e 400  $\mu\text{m}$  [64].

Relativamente à influência da geometria dos poros na viabilidade e proliferação celular, os resultados apresentados na Figura 5.8 indicam um aumento da viabilidade celular com a diminuição do número de ângulos de deposição (de 0/45/90/135° para 0/90°) ao longo dos 21 dias de incubação.



**Figura 5.8:** Percentagem de redução de Alamar Blue™ em função da geometria de poro utilizando células hMSC.

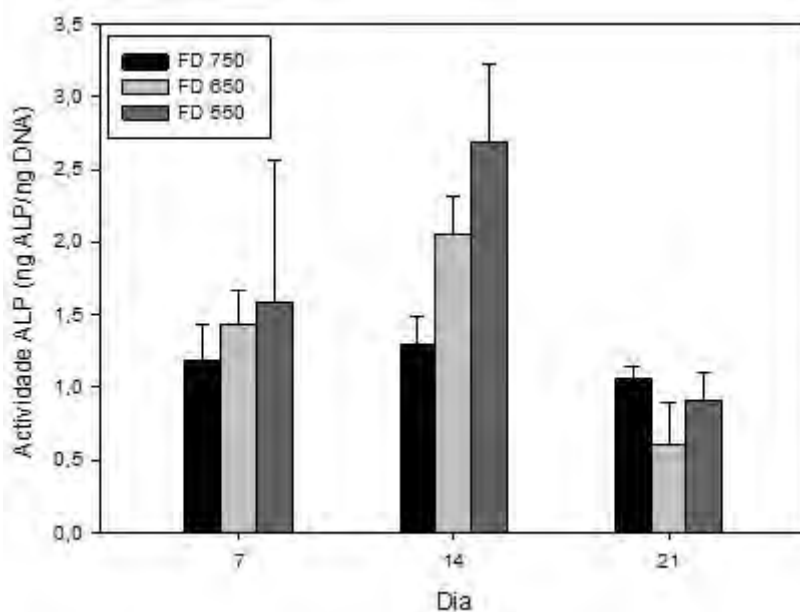
Tal como anteriormente mencionado, os *scaffolds* produzidos com maior número de ângulos de deposição resultam em estruturas com arquiteturas de poro mais complexas (0/90° - geometria quadrangular; 0/60/120° - geometria triangular; 0/45/90/135° - geometrias poligonais complexas). Com base nos resultados obtidos, é possível verificar que esta complexidade geométrica não favorece a viabilidade e proliferação das células hMSC. Teoricamente, devido ao facto de todas as estruturas

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

possuírem canais interconectados, iguais dimensões de poros e porosidade, seria de esperar uma equitativa colonização dos *scaffolds* independentemente do ângulo de deposição. Na realidade, as diferenças detectadas podem estar relacionadas com a maior ou menor acessibilidade que as células têm para migrarem para o interior dos *scaffolds* através dos poros. Ao passar de uma geometria de poro quadrangular, com uma amplitude angular entre filamentos de camadas adjacentes de 90°, para uma geometria poligonal complexa com uma amplitude angular de 45°, a distância angular diminui e por consequência a acessibilidade das células ao interior dos poros também diminui. Deste modo as células tendem a aderir nas camadas mais superficiais das estruturas, apresentando uma reduzida migração e colonização celular dos *scaffolds*. Hoque [365] realizou um trabalho similar utilizando células musculares lisas extraídas de ratos (rSMC) e depositadas directamente em *scaffolds* de PCL e PCL\_PEG (PEG – Polietilenoglicol) com diferentes geometrias de poros. Os resultados obtidos após três semanas de incubação em meio estático não revelaram diferenças relevantes em termos de proliferação celular entre as diferentes geometrias utilizadas. Os autores relacionaram estes resultados com o facto de todas as estruturas apresentarem uma rede de canais internos completamente aberta e interconectada, favorecendo deste modo o fluxo de nutrientes e oxigénio para as células. Apesar destes resultados parecerem contraditórios relativamente aos obtidos no presente estudo, existem factores relevantes que diferenciam os dois trabalhos e que podem ter influência directa nas observações reportadas. O trabalho conduzido por Hoque contemplou o uso de células hSMC, ou seja, uma linha celular completamente diferente daquela utilizada no presente estudo (hMSC). Por consequência o comportamento biológico das células, nomeadamente em termos de adesão, proliferação e diferenciação é completamente diferente e impossível de ser comparado. Adicionalmente, os materiais utilizados (PCL e PCL\_PEG) também apresentam propriedades químicas, biológicas e mecânicas, diferentes daquelas do PCL utilizado neste trabalho. Estas propriedades dos materiais são facilmente detectadas pelas células que por consequência exibem respostas biológicas diferentes de acordo com o substrato onde são depositadas. Finalmente é importante referir que apesar dos ângulos de deposição

utilizados serem iguais, as distâncias entre filamentos (FD) aplicadas por Hoque foram mais elevadas, resultando em poros de maiores dimensões e também de maior acessibilidade.

A diferenciação osteogénica das células hMSC foi avaliada através da actividade da Fosfatase Alcalina (ALP) normalizada. A actividade da ALP é provavelmente um dos marcadores osteogénicos mais utilizados e assume-se que reflecta o grau de diferenciação osteogénica. De um modo geral a actividade da ALP apresenta um pico máximo após um determinado período de tempo, seguindo-se uma diminuição da actividade de ALP com posterior mineralização. Os resultados obtidos em termos de actividade da ALP para os *scaffolds* com diferentes dimensões de poros são indicados na Figura 5.9.



**Figura 5.9:** Actividade da ALP relativa às células hMSC depositadas em *scaffolds* com diferentes dimensões de poros e cultivadas ao longo de 21 dias. Os dados encontram-se reportados na forma de valor médio  $\pm$  desvio padrão e normalizados por ng de DNA.

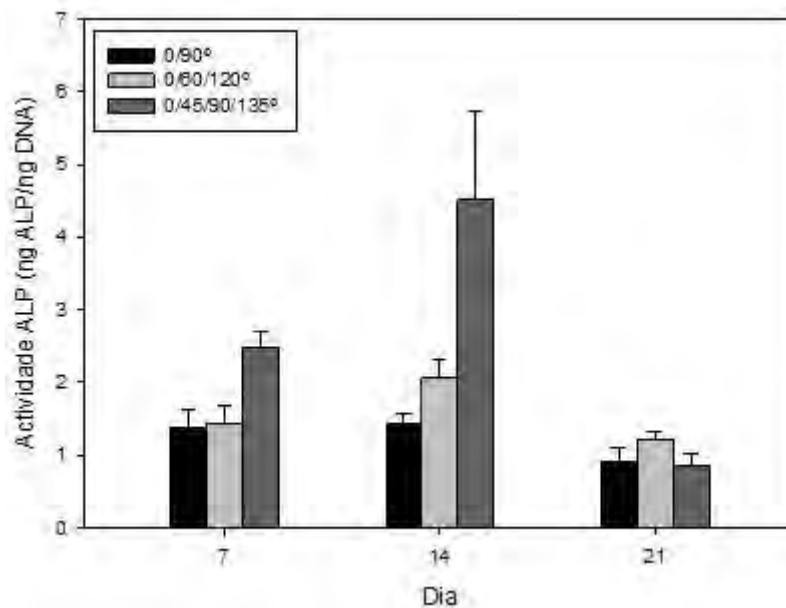
Tal como é possível observar a partir da Figura 5.9, todas as estruturas, independentemente da dimensão de poro, apresentam um aumento significativo da actividade de ALP entre os dias 7 e 14. Estes resultados evidenciam a capacidade que



*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

todas as estruturas apresentam de promover a diferenciação osteogénica das células hMSC. Entre o dia 14 e o dia 21, tal como esperado, verifica-se um decréscimo acentuado da actividade da ALP, relacionado com o processo de mineralização. Este fenómeno resulta da actividade celular (esta associado ao processo osteogénese) e é consequência da formação de complexos de cálcio que inibem a medição da actividade da ALP. Adicionalmente, é possível verificar que os *scaffolds* com menor dimensão de poro (FD =550 µm) apresentam um maior nível de actividade de ALP, nos dias 7 e 14, comparativamente com os *scaffolds* de maior dimensão de poro (FD=650 µm e FD=750 µm). A explicação para este comportamento reside no facto de os *scaffolds* com menor dimensão de poro (menor porosidade) possuírem menos área disponível para as células aderirem e proliferarem, promovendo deste modo um maior contacto intercelular e por consequência um maior nível de diferenciação celular. Contrariamente, os *scaffolds* com maior dimensão de poro (porosidade), apresentam maior área superficial, conduzindo a uma maior adesão e proliferação celular antes do processo de diferenciação. Esta observação é suportada pelos resultados de Alamar Blue™ (Figura 5.7), onde é visível que os *scaffolds* com maior dimensão de poro apresentam um maior índice de viabilidade e proliferação celular.

De uma forma geral, tal como foi anteriormente mostrado, os dados relativos à proliferação celular (Alamar Blue™) estão em linha com os dados relativos à diferenciação celular (actividade de ALP). No caso de estruturas produzidas com igual FD (dimensão de poro e porosidade semelhantes) e ângulos de deposição diferentes (geometria de poro diferente), os resultados da actividade de ALP são apresentados na Figura 5.10. Tal como se mencionou anteriormente para o caso de *scaffolds* com igual dimensão de poro, todas as estruturas apresentam um nível crescente de actividade de ALP ao longo do período de incubação. O nível máximo de ALP, independentemente da geometria, é obtido após 14 dia de incubação, seguindo-se uma redução drástica ao 21 dia devido ao processo de mineralização das estruturas. Estes dados, revelam a capacidade das estruturas 3D em PCL, com diferentes geometrias de poro, em suportar e promover a diferenciação osteogénica das células hMSC.

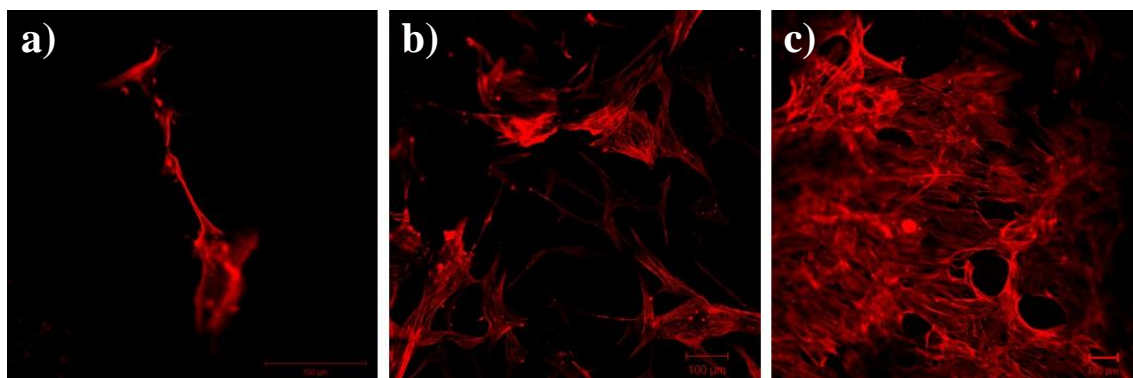


**Figura 5.10:** Atividade da ALP relativa às células hMSC depositadas em *scaffolds* com diferentes geometrias de poro e cultivadas ao longo de 21 dias. Os dados encontram-se reportados na forma de valor médio  $\pm$  desvio padrão e normalizados por ng de DNA.

Os resultados relativos à diferenciação celular (Figura 5.10) estão em linha com os dados fornecidos pelas análises de proliferação celular (Figura 5.8), isto é, os maiores valores de diferenciação celular (atividade de ALP) foram obtidos para estruturas com menor proliferação celular. Tal significa que, no caso específico de estruturas produzidas com diferentes ângulos de deposição (0/90°, 0/60/120° e 0/45/90/135°), a diferenciação de células hMSC é maior em *scaffolds* com poros geometricamente mais complexos (poros poligonais complexos). Uma possível explicação reside na menor acessibilidade que as células possuem de penetrar e proliferar no interior de *scaffolds* com poros de maior complexidade geométrica. Devido a esta incapacidade, as células ao serem depositadas nos *scaffolds*, aderem em maior número na superfície dos mesmos, estabelecendo facilmente ligações intercelulares que as conduzem a um rápido processo de diferenciação. Os resultados obtidos permitiram verificar que o aumento da complexidade geométrica dos poros (de quadrangulares para poligonais complexos) conduzia, por um lado, a uma redução da adesão e proliferação celular, e por outro a um aumento da diferenciação osteogénica.

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

A análise da morfologia celular foi efectuada em todas as estruturas, independentemente da sua dimensão ou geometria de poro, através de microscopia confocal a laser. Os resultados qualitativos obtidos revelam uma evolução clara em termos de adesão celular ao longo do período de incubação. No entanto não foram detectadas diferenças significativas na morfologia das células depositadas e cultivadas nas diferentes tipologias de *scaffolds*. Esta homogeneidade morfológica entre estruturas com geometrias e dimensões de poros diferentes pode estar relacionada com o facto de os materiais, tecnologia de processamento e parâmetros de processo utilizados terem sido mantidos constantes ao longo do trabalho. Como tal decidiu-se apenas reportar as imagens relativas a uma tipologia de *scaffold* em diferentes períodos de tempo, nomeadamente 7, 14 e 21 dias (Figura 5.11).

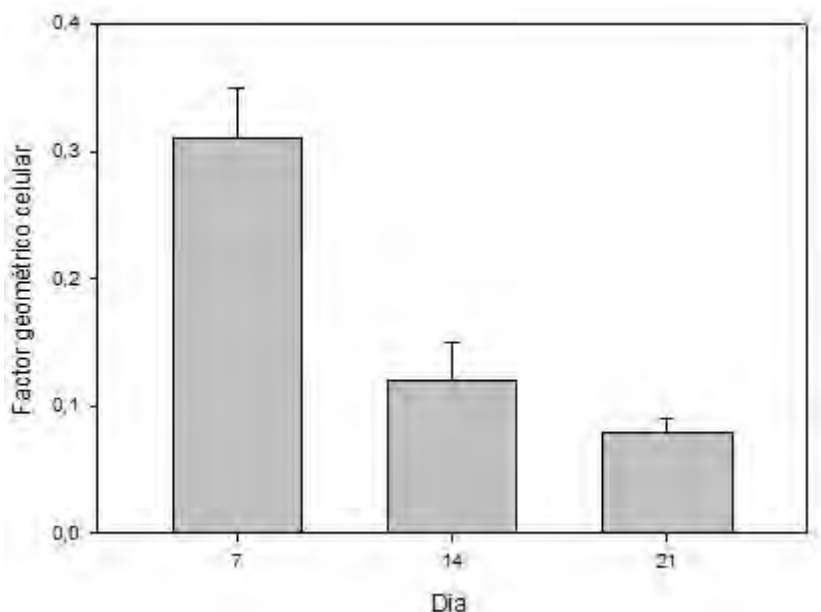


**Figura 5.11:** Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de estruturas *scaffold*/células. Nas imagens são evidenciados os filamentos de actina das células (colorados a vermelho por faloidina) que aderiram ao longo dos filamentos dos *scaffolds* de PCL. A barra de escala tem a dimensão de 100 µm. a) dia 7; b) dia 14; c) dia 21.

Os resultados qualitativos das análises biológicas realizadas às estruturas de PCL vêm confirmar os dados quantitativos obtidos por Alamar Blue™. Tal como é possível observar através da Figura 5.11, todas as estruturas demonstraram uma clara capacidade de promover o aumento da adesão e proliferação das células hMSC ao

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

longo do período de incubação. É ainda visível observar-se a partir da Figura 5.11 que, do dia 7 para o dia 21, o número de células aumentou significativamente recobrando quase por completo os filamentos dos *scaffolds* (Figura 5.11c). A morfologia celular também variou ao longo do período de incubação, passando de uma geometria circular (com poucas ramificações) (Figura 5.11a) para uma geometria filamentar homogénea (com um elevado número de ramificações celulares) (Figura 5.11c). Esta variação indica um aumento dos pontos de contacto *scaffold*-célula e célula-célula, com conseqüente aumento da adesão celular. Com base nas imagens obtidas a partir de microscopia confocal, foram realizados estudos complementares de adesão celular com o objectivo de determinar o factor geométrico das células (*shape factor*). O cálculo do factor geométrico foi efectuado para todas as tipologias de *scaffolds* com base na Equação 5.4. Visto não se terem verificado diferenças relevantes a nível do factor geométrico celular entre as diferentes tipologias de *scaffolds*, decidiu-se reportar apenas o resultado obtido para os *scaffolds* com poros quadrangulares e FD= 750  $\mu\text{m}$ . Neste sentido, os valores obtidos para os dias 7, 14 e 21 encontram-se reportados na Figura 5.12 na forma de valor médio  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 5.12:** Factor geométrico celular calculado a partir de células depositadas em *scaffolds* com FD de 750  $\mu\text{m}$  e ângulo de deposição de 0/90°.

Os valores indicados na Figura 5.12 indicam uma redução do valor do factor geométrico celular ao longo dos 21 dias de incubação. Estes resultados permitem-nos correlacionar a diminuição do valor do factor geométrico celular com o aumento do grau de adesão das células, e por consequência com o aumento da área de adesão celular. De facto, tal como é possível observar-se a partir da Figura 5.11, as células passam de uma geometria circular pouco ramificada e pouco alongada (Figura 5.11c) após 7 dias de incubação, para uma geometria filamentar, alongada e com varias ramificações, com consequente aumento da área de adesão celular (área ocupada pela célula no substrato).

## **5.4 – Sumário**

Este capítulo descreve o estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas dos *scaffolds* em PCL produzidos através do sistema BioCell Printing. Numa primeira fase foi avaliada a capacidade do sistema em produzir *scaffolds* sem alteração das propriedades térmicas, químicas e biológicas iniciais dos materiais (PCL). Os resultados obtidos a partir das análises térmicas (DSC) e químicas (HPLC) efectuadas aos materiais não-processados e processados revelaram que as condições de processamento utilizadas não induzem alterações significativas nas propriedades térmico-químicas dos mesmos. Do ponto de vista biológico, os resultados obtidos a partir dos testes de Alamar Blue<sup>TM</sup>, confirmam a manutenção da biocompatibilidade dos materiais após processamento (*scaffolds*), bem como um aumento significativo da viabilidade e proliferação das células hMSC ao longo de todo o período de cultura *in vitro* (21 dias). A conjugação destes factores permitem validar e confirmar o potencial de aplicação do sistema BioCell Printing na produção de *scaffolds* para ET. A segunda fase deste trabalho consistiu na avaliação da influência da geometria e dimensão de poros nas propriedades morfológicas, mecânicas e biológicas das estruturas 3D em PCL. As micrografias obtidas a partir de SEM revelaram que, independentemente do ângulo de deposição ou distância entre filamentos utilizados, todas as estruturas produzidas apresentam uma rede de canais internos interconectados, homogénea distribuição espacial de poros, boa adesão entre

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

filamentos de camadas adjacentes, e elevada consistência entre os valores teóricos pré-definidos (FD, RW, FG e LG) e os valores reais obtidos. No caso específico de estruturas produzidas com ângulo de deposição constante de  $0/90^\circ$  e distâncias entre filamentos (FD) variáveis entre  $550\ \mu\text{m}$  e  $750\ \mu\text{m}$ , foi possível confirmar a obtenção de estruturas com poros quadrangulares, com dimensões entre  $245\text{-}433\ \mu\text{m}$  e porosidade de  $49\text{-}57\%$ . Por outro lado, adoptando três ângulos de deposição diferentes de  $0/90^\circ$ ,  $0/60/120^\circ$  e  $0/45/90/135^\circ$ , mantendo um FD constante de  $650\ \mu\text{m}$ , foi possível obter *scaffolds* com geometrias de poro quadrangular, triangular e poligonal complexa, respectivamente. As análises mecânicas realizadas à compressão no estado seco revelaram, que aumentando a dimensão dos poros (porosidade) ou o número de ângulos de deposição (geometrias mais complexas), as estruturas apresentavam uma diminuição das suas propriedades mecânicas. Após 21 dias de cultura celular estática, as células hMSC revelaram diferentes comportamentos em termos de adesão, proliferação e diferenciação celular, de acordo com a dimensão e geometria dos poros. Do ponto de vista da proliferação celular foi possível observar que estruturas com maior dimensão de poro (FD= $750\ \mu\text{m}$ ) e geometrias menos complexas ( $0/90^\circ$ ) promoveram um aumento significativo da proliferação e vitalidade celular. Por outro lado, a diferenciação osteogénica das células hMSC, tal como comprovado pelos resultados da actividade de ALP, é superior em *scaffolds* com menor dimensão de poro (FD= $550\ \mu\text{m}$ ) e geometrias mais complexas ( $0/45/90/135^\circ$ ). Tal como previamente mencionado, este facto permite-nos concluir que, de uma forma geral, a proliferação celular é inversamente proporcional à diferenciação celular. Independentemente destas variações, todas as estruturas revelaram uma clara capacidade de suportar e promover a adesão, proliferação e diferenciação celular. Do ponto de vista da morfologia celular, apesar de não se terem verificado variações significativas entre as diferentes tipologias de *scaffolds*, foi possível observar uma variação no número e na forma das células ao longo do período de incubação. Inicialmente (dia 7), o número de células que aderiram na superfície dos filamentos é reduzido e com uma geometria circular. Com o aumento do tempo de incubação (14 e 21 dias) o número de células aumentou passando também estas a apresentar uma forma filamentar homogénea

*Capítulo 5 - Estudo da influência da dimensão e geometria dos poros nas propriedades biomecânicas de scaffolds em Policaprolactona (PCL) produzidos com a BioCell Printing*

(com maior número de ramificações celulares). Esta variação na forma das células foi confirmada pela variação do factor geométrico, que diminuiu ao longo dos 21 dias de cultura. Esta diminuição reflecte o aumento da área de adesão celular bem como do grau de adesão das células hMSC. Com base neste estudo foi possível demonstrar o elevado potencial da BioCell Printing na modulação precisa da arquitectura interna/externa de *scaffolds* em PCL, através da simples manipulação dos parâmetros de design, com o objectivo de cumprir os requisitos biomecânicos necessários para a correcta adesão, proliferação e diferenciação osteogénica de células hMSC. A flexibilidade e precisão do sistema oferece ainda a possibilidade de, futuramente, estender o trabalho já realizado a outros *scaffolds* com materiais e arquitecturas diferentes, utilizando linhas celulares e condições de cultura diversas (cultura celular dinâmica *in vitro* ou *in vivo*). Deste modo será possível obter dados relevantes que nos permitam aumentar o nosso conhecimento a nível da interacção entre materiais, células e tecidos, e por consequência criar novas oportunidades na área de ET.

## Capítulo 6 – Desenvolvimento de *scaffolds* bioactivos à base de Policaprolactona e Hidroxiapatita.

---

A produção de *scaffolds* com propriedades biomecânicas adequadas para a regeneração óssea depende de inúmeros factores, nomeadamente do material utilizado, dimensão e geometria dos poros, interconectividade das estruturas, tecnologias de produção, etc. Tal como verificado no Capítulo 5, o comportamento mecânico dos *scaffolds* de PCL bem como a adesão, proliferação e diferenciação de células hMSC são altamente influenciados pela geometria e porosidade das estruturas produzidas. O PCL apesar de ser um material biocompatível, biodegradável e facilmente processável, apresenta uma baixa capacidade de promover a adesão, proliferação e diferenciação celular, essencialmente devido às suas características hidrofóbicas. Adicionalmente, as propriedades mecânicas dos *scaffolds* de PCL produzidos por extrusão são bastante inferiores às propriedades do osso nativo (Capítulo 5). Por este motivo a produção de *scaffolds* compósitos bifásicos à base de fosfatos de cálcio tem vindo a ganhar um enorme interesse por parte da comunidade científica. A similaridade química e estrutural existente entre a HA e a fase mineral do osso nativo conferem uma elevada osteocompatibilidade, osteocondutividade e osteoindutividade às estruturas compósitas produzidas, aumentando a estabilidade do implante e diminuindo o risco de imuno-rejeição. No entanto, a adição de HA ou outros fosfatos de cálcio não garantem por si só o cumprimento dos requisitos biológicos e mecânicos essenciais para a correcta regeneração do tecido ósseo. A natureza e granulometria dos fosfatos de cálcio têm igualmente um contributo decisivo no desempenho mecânico e biológico dos implantes. Assim, por exemplo, caso a dimensão dos grãos de HA seja demasiado elevada, pode ocorrer a formação de zonas de tensão localizadas que conduzem à diminuição da resistência mecânica dos *scaffolds*. Do ponto de vista biológico, a localização de partículas de HA de elevadas dimensões à superfície dos *scaffolds*, com conseqüente variação da topografia



superficial (aumento da rugosidade) pode limitar igualmente a proliferação celular bem como a sua diferenciação (que depende dos contactos intercelulares). Por estes motivos torna-se essencial efectuar um estudo preciso que nos permita determinar com elevado grau de confiança qual a natureza e extensão da influência da granulometria da HA no comportamento biomecânico de *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo. Neste capítulo é descrito o procedimento adoptado para a produção de *scaffolds* bioactivos de base polimérica (PCL) contendo nano e micro partículas de HA. O objectivo deste estudo consistiu em determinar o efeito da adição de HA e da sua granulometria nas propriedades mecânicas e biológicas dos *scaffolds* produzidos. Para tal foram considerados dois tipos de HA (ver secção 6.2), uma com dimensões médias de 200 nm e outra com dimensões de 5 µm. As misturas de PCL/HA (25% em massa de HA) foram preparadas por *melt blending* utilizando um sistema de mistura comercial (Brabender® GmbH & Co. KG, Alemanha).

## **6.1 – Introdução**

A criação de um ambiente com propriedades biomecânicas adequadas ao crescimento celular tridimensional, é um factor crucial no processo de regeneração óssea. Deste modo, os requisitos dos *scaffolds* e dos materiais utilizados na sua produção, têm vindo a mudar ao longo dos anos, passando de sistemas bioinertes para sistemas bioactivos capazes de integrar biomoléculas e/ou células e interagindo de forma mais eficaz com os tecidos [53, 366]. No caso específico da regeneração óssea, os materiais devem ser preferencialmente osteoindutivos (capazes de promover a diferenciação osteoblástica de células indiferenciadas), osteocondutivos (suportando e promovendo o crescimento ósseo) e osteointegradores (através da integração com os tecidos nativos adjacentes). A pesquisa e aplicação de materiais para produção de implantes ósseos capazes de substituir (pelo menos parcialmente) os habituais implantes autogénicos e alogénicos tem sido muito intensa e vasta [367-369]. Ao longo dos últimos 20 anos têm sido reportados, com maior ou menor sucesso, estudos realizados com base na utilização de materiais cerâmicos e poliméricos para a produção de *scaffolds* para regeneração óssea [370-373] Dentro da classe dos materiais poliméricos biodegradáveis destacam-se o PCL, ácido poliláctico (PLA) e ácido poliglicólico (PGA),

## *Capítulo 6 - Desenvolvimento de scaffolds bioactivos à base de Policaprolactona e Hidroxiapatita.*

sobretudo devido à sua biocompatibilidade e facilidade de processamento [374-376]. O PCL apresenta de facto propriedades muito interessantes que o tornam um material extremamente atractivo na produção de *scaffolds* para regeneração óssea, nomeadamente devido à sua baixa taxa de degradação (2 a 4 anos *in vivo*), elevada estabilidade térmica e química, boa biocompatibilidade e baixo custo [377-379]. No entanto a sua utilização encontra-se algo limitada devido à baixa bioactividade, impedindo uma boa fixação entre o implante e o tecido nativo. Desta forma, a utilização de materiais cerâmicos, nomeadamente fosfatos de cálcio, torna-se extremamente importante na produção de *scaffolds* bioactivos [380-382]. A HA e o TCP são componentes inorgânicos que apresentam uma composição química muito semelhante à fase mineral do osso nativo. Esta similaridade química é determinante no processo de deposição de apatita (*in vitro* e *in vivo*), adsorção de proteínas e subsequente regeneração óssea [383]. Contudo a sua utilização é bastante limitada devido ao seu comportamento mecânico frágil e baixa resistência à tracção. Estes aspectos são altamente limitadores em aplicações ósseas onde o *scaffold* se encontra sujeito a elevados esforços mecânicos, nomeadamente de torção e flexão [384]. Por sua vez os materiais compósitos bifásicos (orgânico-inorgânico) possuem a capacidade de conjugar a boa resistência mecânica dos polímeros com a elevada resistência à compressão dos cerâmicos, mimetizando assim as propriedades biomecânicas do osso nativo [385]. Através da manipulação das quantidades e natureza dos constituintes da estrutura compósita é possível criar *scaffolds* bioactivos com elevado desempenho mecânico e apropriada cinética de degradação.

De uma forma geral os resultados reportados na literatura demonstram um aumento das propriedades mecânicas e biológicas das estruturas devido à introdução de fosfatos de cálcio [386-388]. No entanto, continuam a ser raros ou inexistentes os trabalhos onde se investiga o efeito da granulometria dos fosfatos de cálcio no comportamento mecânico e na actividade celular dos *scaffolds*. Este facto pode dever-se à dificuldade que existe na obtenção de materiais cerâmicos comerciais (devido ao elevado custo e variabilidade no cumprimento dos requisitos impostos pela *Food and Drug Administration*) bem como à complexidade inerente à preparação e obtenção de compósitos poliméricos com partículas cerâmicas homogeneamente distribuídas [389].

Deste modo, o trabalho reportado neste Capítulo teve como objectivo central o estudo da influência da granulometria das partículas de HA nas propriedades biomecânicas dos *scaffolds*. De acordo com a pesquisa bibliográfica efectuada, a presente dissertação corresponde ao primeiro estudo comparativo realizado *in vitro*, onde é avaliada a influência da dimensão das partículas de HA no comportamento mecânico e biológico (adesão, proliferação e diferenciação celular) de *scaffolds* à base de PCL. Importa ainda realçar que, contrariamente a outros estudos, o método utilizado para a preparação das misturas de PCL/HA (*melt blending*) não requer o uso de solventes orgânicos com elevado potencial de toxicidade para as células. Os resultados obtidos podem vir a melhorar de forma substancial o nosso conhecimento relativamente ao comportamento mecânico e biológico de nano e micro compósitos, permitindo otimizar o *design* e produção de *scaffolds* para regeneração óssea.

## **6.2 – Materiais e Métodos**

### *6.2.1 - Preparação de misturas PCL/HA*

Para a produção de *scaffolds* compósitos foram inicialmente preparadas duas misturas à base de PCL utilizando dois tipos de HA com granulometrias distintas (Capítulo 3): nano partículas de HA (PCL\_HA\_S) e micro partículas de HA (PCL\_HA\_F). As misturas PCL/HA (25% em massa de HA) foram preparadas por *melt blending* utilizando uma misturadora Plastograph® EC (Brabender® GmbH & Co. KG, Alemanha). Numa primeira fase foram pesadas as quantidades adequadas de HA, colocadas num vidro de relógio e secas numa estufa a 100°C durante 2 horas. Posteriormente o PCL granular foi pesado e colocado no Brabender a 100°C e 40 rpm durante 10 minutos. Em seguida foi adicionada a HA ao PCL e a mistura foi mantida no Brabender durante mais 30 minutos a 100°C e 40 rpm de forma a promover a completa homogeneização do sistema compósito. Por fim as misturas foram retiradas do Brabender e colocadas numa prensa hidráulica com o objectivo de obter filmes de PCL/HA. Após a sua obtenção, os filmes foram cortados em *pellets*, colocados num exsiccador e submetidos a vácuo durante 24 horas para total remoção de humidade. Este procedimento foi adoptado para a preparação de todas as misturas independentemente da granulometria da HA.

### 6.2.2 – Design e produção de scaffolds de PCL/HA

A produção de *scaffolds* de PCL e PCL/HA (PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F) foi realizada no sistema BioCell Printing descrito no Capítulo 4. Para tal foram desenhados num *software* de CAD (SolidWorks, Dassault Systèmes S.A.) prismas rectangulares com dimensões externas de 30 (comprimento) x 30 (largura) x 8 mm (altura). De seguida, independentemente do material utilizado foram impostos um ângulo de deposição e uma distância entre filamentos (FD) constantes de 0/90° e 750 µm, respectivamente. A escolha dos ângulos e da FD foi baseada nos resultados mecânicos e biológicos indicados no Capítulo 5. Os parâmetros de processo utilizados na produção das estruturas são indicados na Tabela 6.1. Todas as estruturas foram posteriormente cortadas em blocos de menores dimensões de acordo com as análises a realizar.

**Tabela 6.1:** Parâmetros de processo e sistema utilizados para a extrusão de *scaffolds* compósitos de PCL/HA. Os parâmetros representados referem-se à velocidade de deposição (DV), *slice thickness* (ST), temperatura de fusão (LT), pressão de extrusão (EP) e velocidade de rotação do fuso (SRV).

Parâmetros de processo/sistema				
DV (mm/s)	ST (µm)	LT (°C)	EP (bar)	SRV (rpm)
10	280	90	5	30

### 6.2.3 – Caracterização dos scaffolds

#### **Microscopia electrónica de varrimento (SEM)**

A morfologia dos *scaffolds* foi estudada recorrendo a microscopia electrónica de varrimento (SEM, FEI Quanta 600F). As imagens de topo e secção transversal dos *scaffolds* foram obtidas em condições de baixo vácuo, voltagem de 12.5 kV e uma pressão de 0.6 Torr. As micrografias obtidas foram utilizadas para verificar e validar a integridade micro-estrutural dos *scaffolds*, distribuição espacial dos poros, adesão entre camadas adjacentes e consistência entre valores teóricos pré-definidos (Tabela 6.2) e experimentais. As imagens obtidas foram também utilizadas para observar e

determinar a homogeneidade da distribuição das nano e micro partículas de HA na superfície e no interior dos filamentos. A composição química elementar da superfície das estruturas foi determinada através de espectroscopia por energia dispersiva de raios-x (EDS, do inglês *Energy-dispersive X-ray Spectroscopy*), utilizando um sistema Oxford INCAx-sight. Os dados obtidos permitiram determinar, de forma qualitativa, a presença de HA na superfície dos *scaffolds*.

**Tabela 6.2:** Valores teóricos pré-definidos para a construção de *scaffolds* em PCL e PCL/HA.

Ângulo Deposição (°)	FD (µm)	RW (µm)	FG (µm)	LG (µm)	Porosidade (%)
0/90°	750	300	450	280	64

#### **Microtomografia computadorizada 3D (µ-CT)**

A microtomografia computadorizada 3D (µCT) foi realizada com recurso a um sistema SkyScan 1072 (Aartselaar, Bélgica), aplicando incrementos rotacionais de 0,9° ao longo de um ângulo total de 180°. As secções transversais e os modelos 3D dos *scaffolds* foram posteriormente reconstruídos utilizando os *softwares* do equipamento SkyScan bem como os softwares Image J (National Institutes of Health, E.U.A), Mimics (Materialise, Bélgica) e RapidForm (INUS Technology, Inc, Alemanha). As microtomografias obtidas permitiram determinar o grau de interconectividade das estruturas bem como o nível de porosidade das mesmas. O cálculo da porosidade e interconectividade foi efectuado de acordo com os seguintes modelos matemáticos:

$$Porosidade = \frac{Vol_{Poros}}{Vol_{Poros} + Vol_{scaff}} \times 100 \quad (6.1)$$

onde  $Vol_{Poros}$  corresponde ao volume total ocupado pelos poros e  $Vol_{scaff}$  corresponde ao volume total de material do *scaffold*.

$$\text{Interconectividade} = \frac{\text{Vol}_{\text{PorosInter}}}{\text{Vol}_{\text{PorosInter}} + \text{Vol}_{\text{PorosFech}}} \times 100 \quad (6.2)$$

em que  $\text{Vol}_{\text{PorosInter}}$  corresponde ao volume total de poros interconectados e  $\text{Vol}_{\text{PorosFech}}$  corresponde ao volume total de poros fechados (não interconectados).

### **Análise termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica foi efectuada utilizando um sistema STA 6000 (Perkin Elmer) e teve como objectivo a determinação experimental da massa de HA presente nos *scaffolds* compósitos. Para tal foram inicialmente pesadas três amostras de cada material (com massas semelhantes), nomeadamente PCL não processado (PCL\_Granular), PCL processado (PCL) e *scaffolds* de PCL/HA (PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F). As amostras foram sucessivamente colocadas no sistema TGA, mantidas a uma temperatura constante de 15°C durante 1 minuto e de seguida aquecidas até 600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. O tratamento gráfico dos resultados obtidos e a determinação do resíduo inorgânico foi efectuada por recurso ao software do equipamento (Pyris R10) e ao software SigmaPlot (SigmaPlot 11.0, Systat Software Inc).

### **Análises mecânicas**

A determinação da influência da granulometria da HA nas propriedades mecânicas dos *scaffolds* de PCL foi efectuada através de ensaios mecânicos realizados à compressão. As amostras referentes aos *scaffolds* a caracterizar foram inicialmente cortadas em blocos com comprimento ( $c$ ) de 5 mm, largura ( $l$ ) de 5 mm e altura ( $h$ ) de 8 mm. De seguida foram comprimidas no estado seco a uma taxa de compressão de 1 mm/min até um valor máximo de extensão de 0,5 mm/mm, utilizando um sistema INSTRON 5566 equipada com uma célula de carga de 10 kN (Figura 6.1). A tensão aparente  $\sigma$  e a extensão  $\epsilon$  foram determinadas tal como descrito no Capítulo 5.



**Figura 6.1:** Scaffold 3D submetido à compressão utilizando uma INSTRON 5566 equipada com uma célula de carga de 10 kN.

#### ***Análises biológicas – Adesão, proliferação e diferenciação celular***

Os testes biológicos foram realizados utilizando células mesenquimais estaminais humanas extraídas a partir medula óssea (hMSC, Clonetics, Itália), e tiveram como objectivo determinar a influência da presença e dimensão das partículas de HA no processo de adesão, proliferação e diferenciação celular. O protocolo utilizado para a expansão das células hMSC e para a esterilização dos *scaffolds* foi descrito com detalhe no Capítulo 5. A adesão e proliferação celular foram determinadas quantitativamente através do método de Alamar Blue™. Para tal, as células ( $17 \times 10^3$ ) foram colocadas

## *Capítulo 6 - Desenvolvimento de scaffolds bioactivos à base de Policaprolactona e Hidroxiapatita.*

em 200 µL de meio de cultura e depositadas directamente sobre os *scaffolds* de PCL, PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F. O número de células viáveis foi determinado, em intervalos de tempo pré-determinados de 7, 14 e 21 dias, através da correlação directa com a magnitude de redução do corante e expresso em percentagem de redução de Alamar Blue™ (ver descrição apresentada no Capítulo 5).

A determinação do grau de expressão osteogénica das células hMSC foi realizada através da medição da actividade da Fosfatase Alcalina (ALP), em intervalos de tempo pré-determinados de 7, 14 e 21 dias, aplicando o protocolo descrito no Capítulo 5.

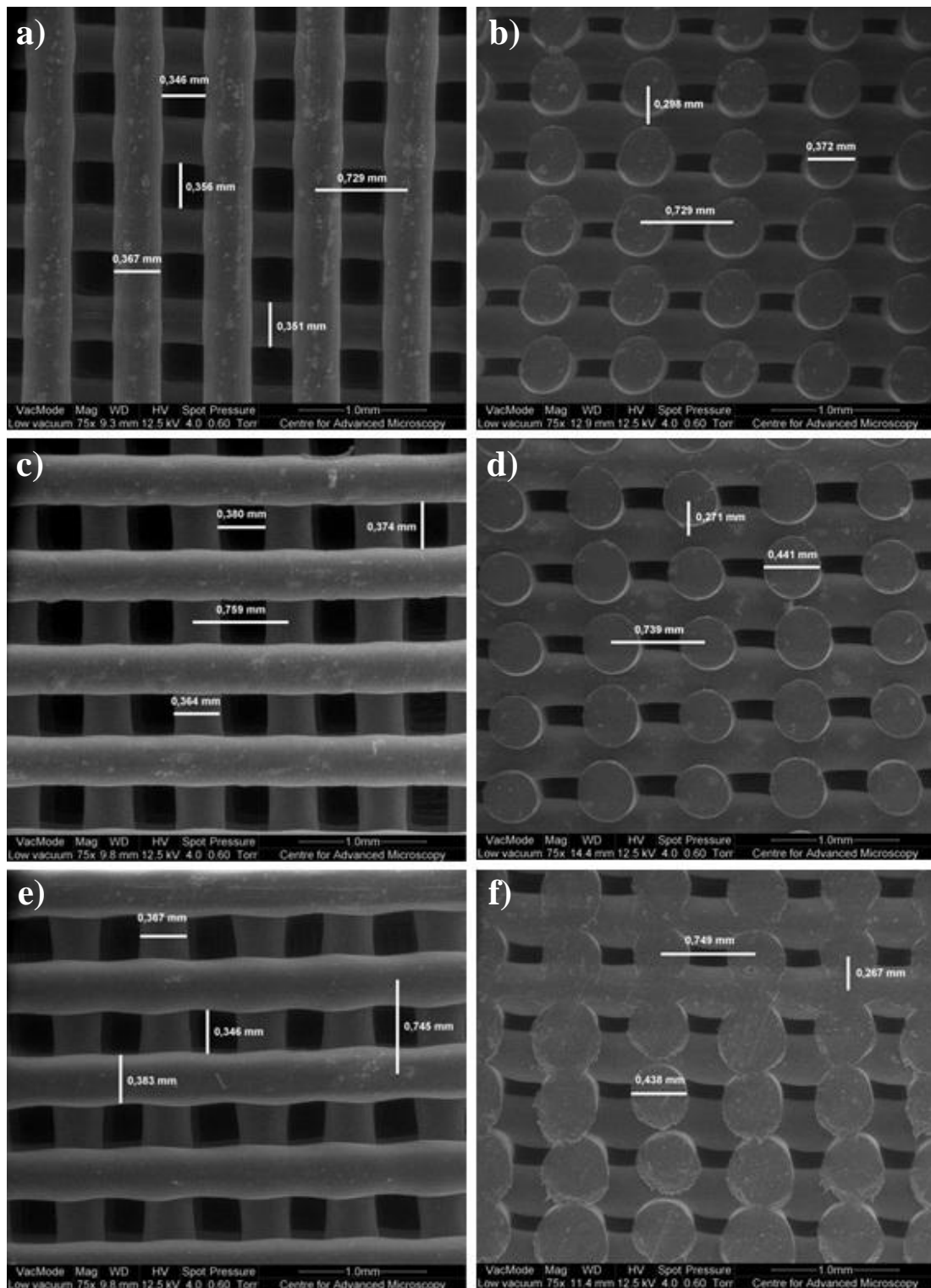
A variação da morfologia celular, função da presença de HA e da sua granulometria, foi avaliada com recurso a um microscópio confocal de varrimento por laser (Zeiss LSM 510/ConfoCor 2). As imagens foram obtidas ao 7, 14 e 21 dia de incubação (ver protocolo apresentado no Capítulo 5). A variação do grau de adesão celular ao longo do período de incubação (21 dias) foi determinado através do cálculo do factor geométrico celular (Capítulo 5).

### **6.3 Resultados e discussão**

#### ***Microscopia electrónica de varrimento (SEM)***

As micrografias dos *scaffolds* de PCL, PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F produzidas com ângulo de deposição de 0/90º e FD de 750 µm são indicadas na Figura 6.2.





**Figura 6.2:** Imagens SEM de *scaffolds* em PCL, PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F. a) vista de topo PCL; b) vista secção transversal PCL; c) vista de topo PCL\_HA\_S; d) vista secção transversal PCL\_HA\_S; e) vista de topo PCL\_HA\_F; f) vista secção transversal PCL\_HA\_F.

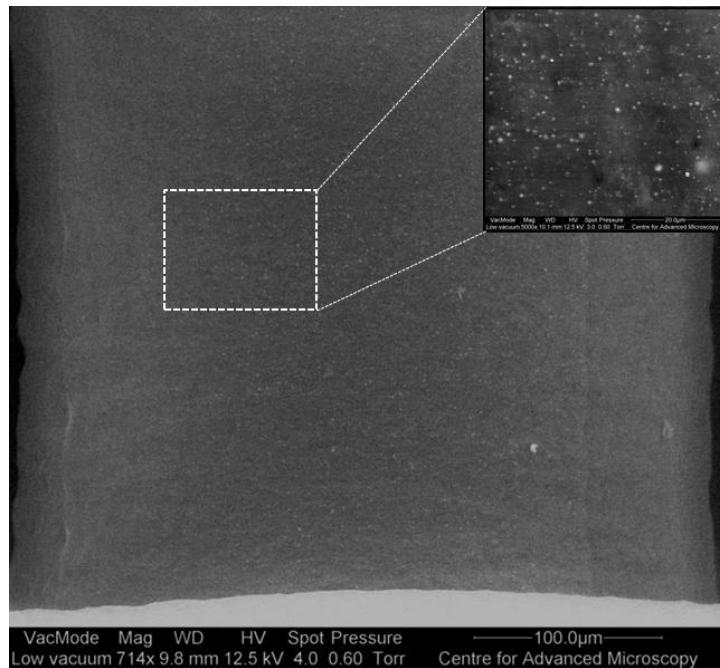
A partir das micrografias apresentadas na Figura 6.2 é possível verificar que todas as estruturas apresentam uma distribuição espacial regular de poros quadrados. Através da análise das imagens da secção transversal é também possível observar a existência de uma boa adesão entre filamentos de camadas adjacentes. Este é um factor de extrema importância para a manutenção da elevada estabilidade estrutural e mecânica das estruturas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Na Tabela 6.3 indicam-se os valores reais obtidos para o diâmetro de filamento (RW), espaçamento entre filamentos (FG) e espaçamento entre camadas (LG). Os resultados mostram existir uma boa correlação entre os valores teóricos pré-definidos e os valores reais obtidos. No entanto, o valor relativo ao diâmetro dos filamentos extrudidos (RW) é ligeiramente superior ao diâmetro interno do *nozzle* utilizado (300  $\mu\text{m}$ ). Este facto deve-se à necessidade que houve em se aumentar a temperatura de fusão (LT) de 80° para 90° de modo compensar o aumento da viscosidade do compósito PCL/HA comparativamente ao PCL. O aumento da temperatura traduziu-se numa redução da viscosidade do material a processar e consequentemente no aumento do diâmetro dos filamentos extrudidos.

**Tabela 6.3:** Características morfológicas dos *scaffolds* compósitos extrudidos com ângulo de deposição 0/90° e FD de 750 $\mu\text{m}$ .

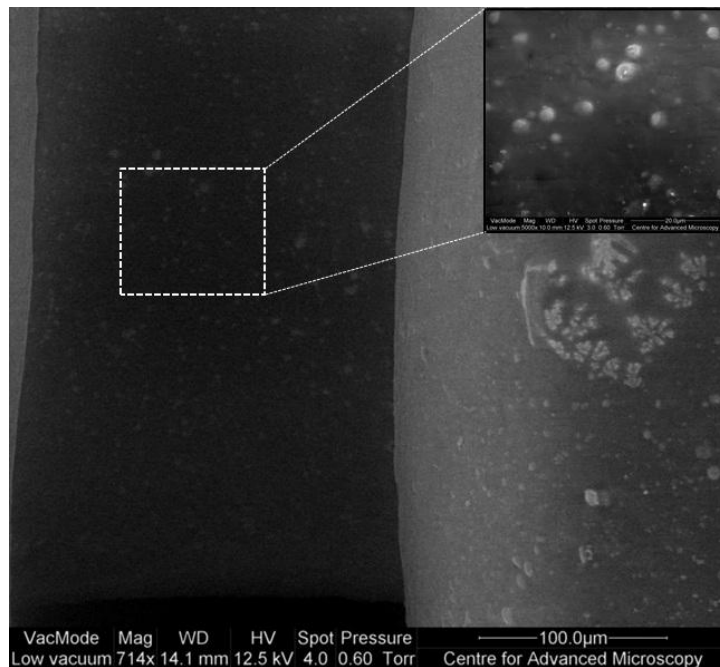
<i>Scaffold</i>	RW ( $\mu\text{m}$ )	FG ( $\mu\text{m}$ )	LG ( $\mu\text{m}$ )
PCL	360 $\pm$ 8	356 $\pm$ 11	140 $\pm$ 11
PCL_HA_S	373 $\pm$ 8	378 $\pm$ 3	156 $\pm$ 11
PCL_HA_F	381 $\pm$ 14	371 $\pm$ 22	157 $\pm$ 14

Através de SEM foi também possível avaliar qualitativamente a distribuição das partículas de HA à superfície e no interior dos filamentos dos *scaffolds* (Figuras 6.3 a Figura 6.6).

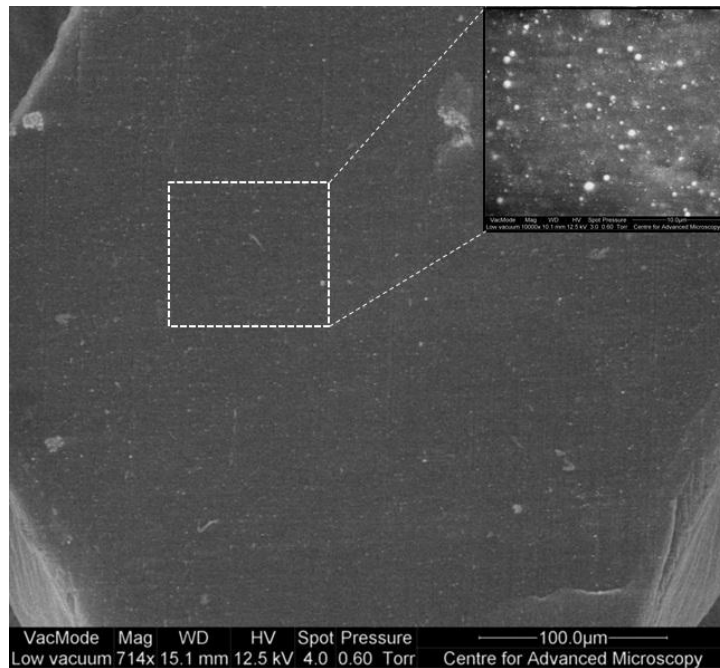
*Capítulo 6 - Desenvolvimento de scaffolds bioativos à base de Policaprolactona e Hidroxiapatita.*



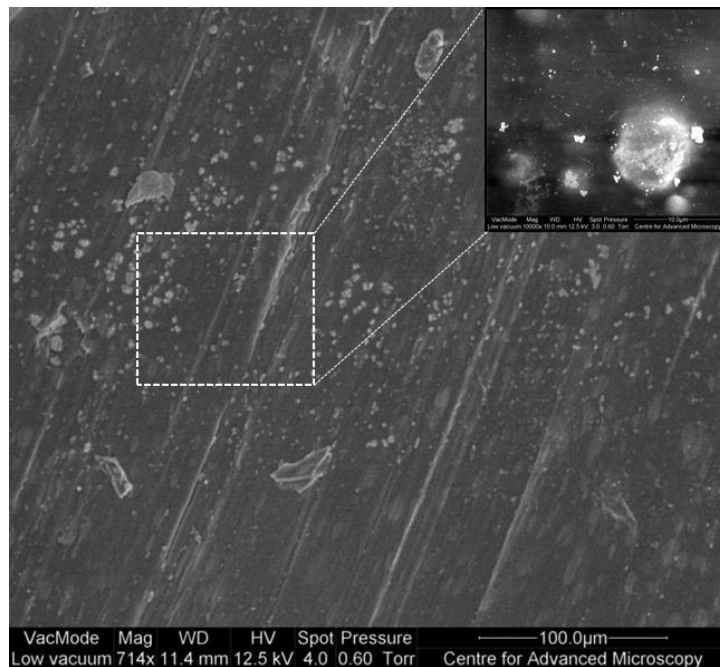
**Figura 6.3:** Vista de topo do filamento de PCL\_HA\_S obtida por SEM. Canto superior direito: ampliação 5000x.



**Figura 6.4:** Vista de topo do filamento de PCL\_HA\_F obtida por SEM. Canto superior direito: ampliação 5000x.

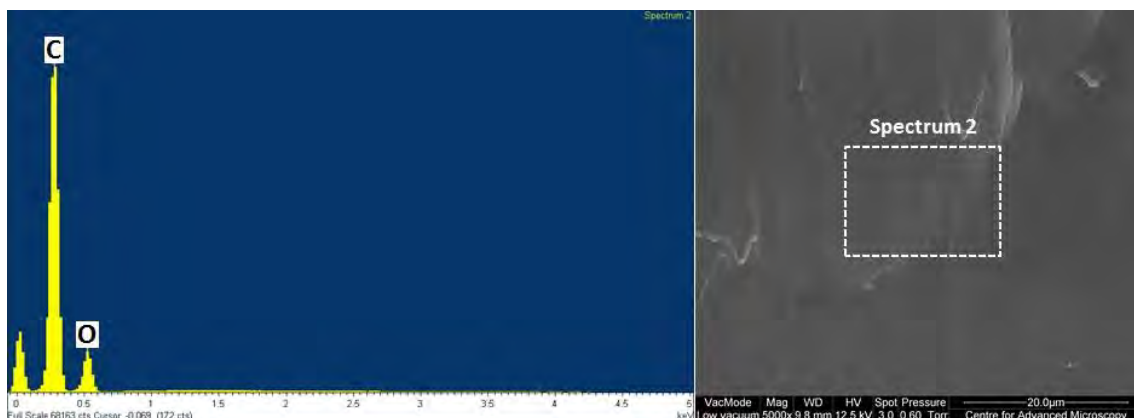


**Figura 6.5:** Vista secção transversal do filamento de PCL\_HA\_S obtida por SEM. Canto superior direito: ampliação 10000x.

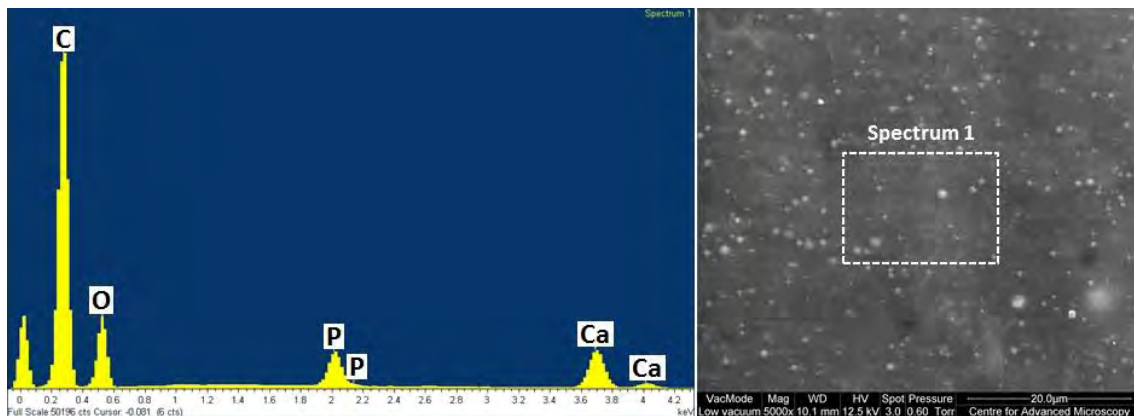


**Figura 6.6:** Vista secção transversal do filamento de PCL\_HA\_F obtida por SEM. Canto superior direito: ampliação 10000x.

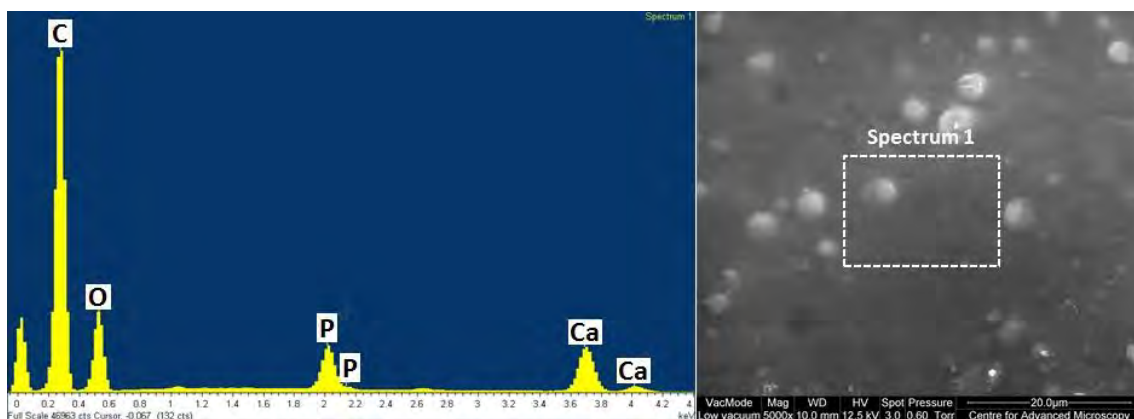
A partir das micrografias da superfície (Figuras 6.3 e 6.4) e secção transversal (Figuras 6.5 e 6.6), é possível verificar que o processo de mistura utilizado na preparação dos compósitos de PCL/HA (*melt blending*) permitiu obter *scaffolds* com uma distribuição muito homogénea das partículas de HA ao longo da matriz de PCL (superfície e interior do filamento). Contudo, apesar de ambas as misturas se apresentarem bastante homogéneas, é notória uma distribuição mais fina das partículas cerâmicas nos *scaffolds* de PCL\_HA\_S. Esta observação é confirmada pelas ampliações presentes nas Figuras 6.3 a 6.6. Nestas Figuras é visível que as partículas de HA\_F (micro HA) formam agregados de dimensões muito superiores às partículas de HA\_S (nano HA). Deste modo, os *scaffolds* PCL\_HA\_F apresentam uma distribuição mais heterogénea e grosseira (maiores dimensões) das partículas de HA comparativamente aos *scaffolds* de PCL\_HA\_S. Os resultados das análises EDX realizadas aos *scaffolds* de PCL e PCL/HA são indicados nas Figuras 6.7 a 6.9. Estes resultados validam as análises realizadas por SEM e confirmam a presença de HA na superfície dos *scaffolds* compósitos. Os picos referentes ao cálcio e fósforo indicados nas Figuras 6.8 e 6.9, demonstram a existência de uma fase apatítica. Por outro lado, é ainda possível observar-se a existência de dois picos de maior intensidade correspondentes aos elementos Carbono (C) e Oxigénio (O) característicos da matriz de PCL. No caso de *scaffolds* de PCL não se observa, tal como esperado, a presença de Ca e P.



**Figura 6.7:** Análise qualitativa dos picos referentes aos elementos Carbono (C) e Oxigénio (O) característicos do PCL presente na superfície dos *scaffolds* de PCL.



**Figura 6.8:** Análise qualitativa dos picos referentes aos elementos Fósforo (P) e Cálcio (Ca) característicos da HA presente na superfície dos *scaffolds* de PCL\_HA\_S.



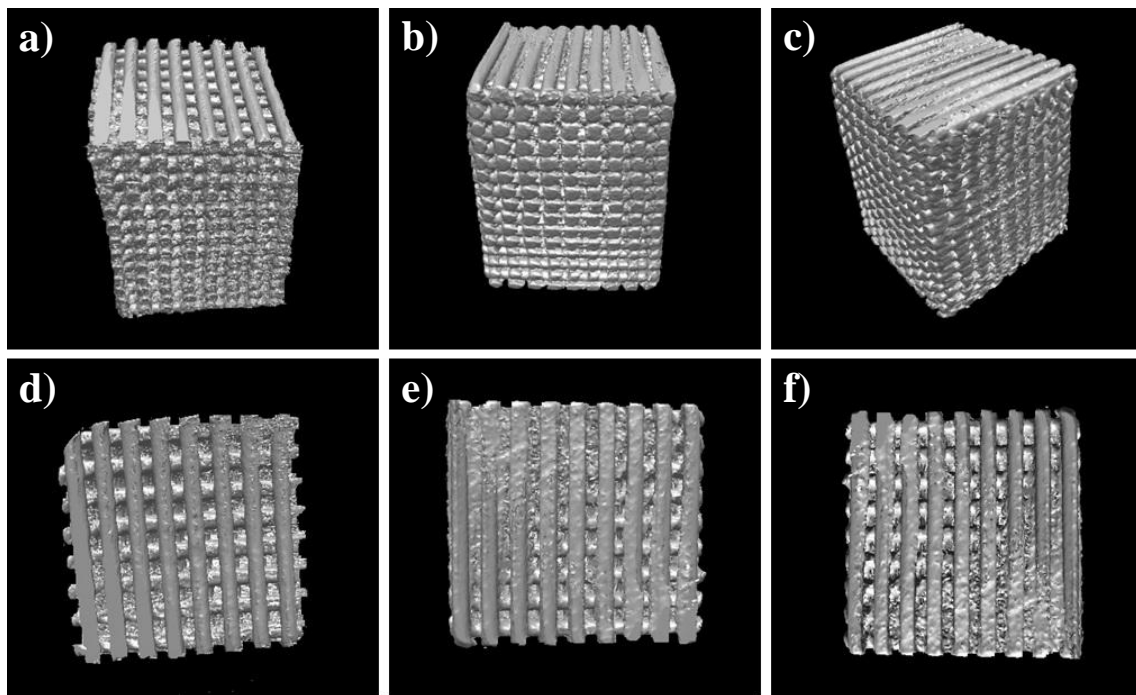
**Figura 6.9:** Análise qualitativa dos picos referentes aos elementos Fósforo (P) e Cálcio (Ca) característicos da HA presente na superfície dos *scaffolds* de PCL\_HA\_F.

### **Microtomografia computadorizada 3D ( $\mu$ -CT)**

As reconstruções 3D dos *scaffolds* de PCL e PCL/HA foram efectuadas por microtomografia computadorizada 3D ( $\mu$ -CT) e indicam-se na Figura 6.10. Os resultados, comprovam que independentemente do material utilizado, todos os *scaffolds* apresentam uma estrutura de canais internos totalmente interconectados (100% de interconectividade) com um nível de porosidade muito semelhante e com um valor médio de 58% (Tabela 6.4)

**Tabela 6.4:** Valores experimentais de porosidade e interconectividade relativos aos scaffolds de PCL e PCL/HA.

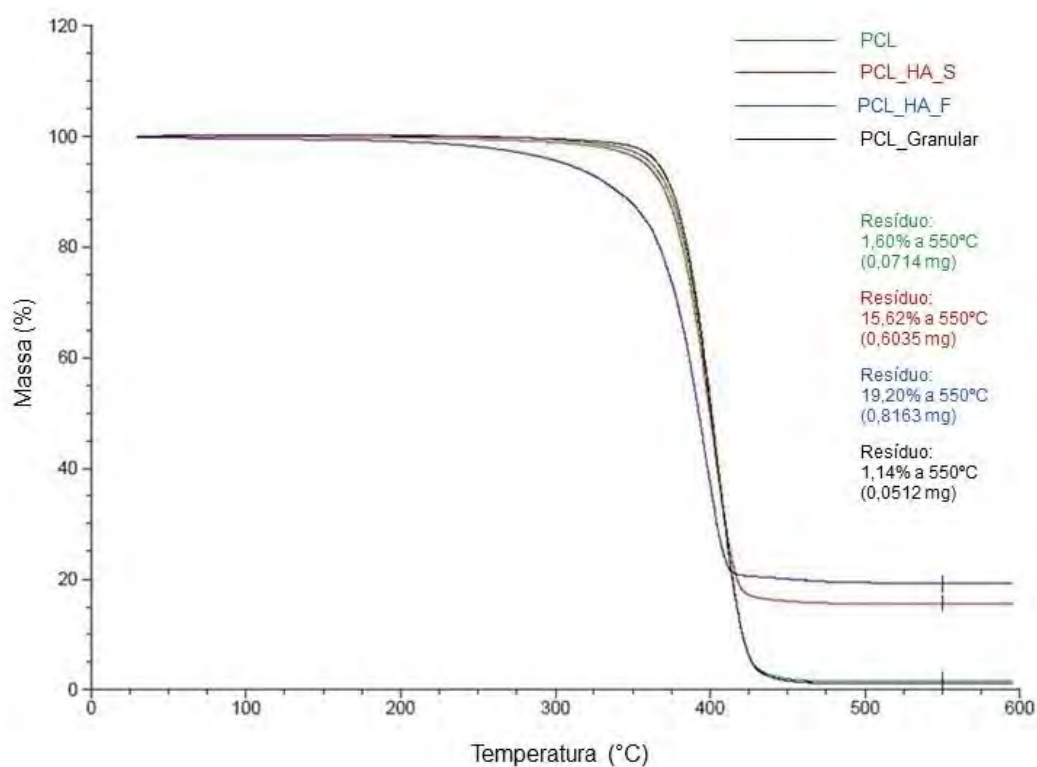
<i>Scaffold</i>	Porosidade (%)	Interconectividade (%)
PCL	58	100
PCL_HA_S	58	100
PCL_HA_F	58	100



**Figura 6.10:** Reconstrução 3D obtida a partir microtomografias de *scaffolds* de PCL e PCL/HA. a) Vista lateral *scaffold* PCL; b) Vista lateral *scaffold* PCL\_HA\_S; c) Vista lateral *scaffold* PCL\_HA\_F; d) Vista de topo *scaffold* PCL; e) Vista de topo *scaffold* PCL\_HA\_S; Vista de topo *scaffold* PCL\_HA\_F.

### Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria foi utilizada para determinar a percentagem de HA existente nos scaffolds compósitos e por consequência a eficácia da técnica de preparação das misturas. As amostras, com peso médio de 10 mg foram retiradas a partir de diferentes pontos dos scaffolds, de forma completamente aleatória. De seguida, as amostras foram aquecidas desde 15°C até 600°C com uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 6.11 e ilustram as curvas características do PCL não processado (PCL\_Granular), PCL processado (scaffold de PCL), scaffolds compósitos (PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F). A temperatura de degradação das amostras foi determinada directamente a partir das curvas obtidas, no ponto correspondente a 1% de perda de massa. A percentagem de resíduo inorgânico foi determinada à temperatura de 550°C de forma a garantir a total inexistência de material polimérico.



**Figura 6.11:** Curvas termogravimétricas correspondentes ao PCL não processado (PCL\_Granular), PCL processado/scaffold (PCL), scaffold nano compósito (PCL\_HA\_S) e scaffold micro compósito (PCL\_HA\_F).



## *Capítulo 6 - Desenvolvimento de scaffolds bioactivos à base de Policaprolactona e Hidroxiapatita.*

Através da comparação da percentagem de resíduo presente nas amostras é possível verificar-se que, independentemente da granulometria, a percentagem em massa de HA presente nos *scaffolds* compósitos é inferior ao teoricamente definido (25%). Isto significa que durante o processo de preparação das misturas por *melt binding* houve uma perda de massa de HA. Esta perda pode estar associada à massa de HA que aderiu ao recipiente utilizado para efectuar a transferência ou então a HA que se depositou no interior do Brabender.

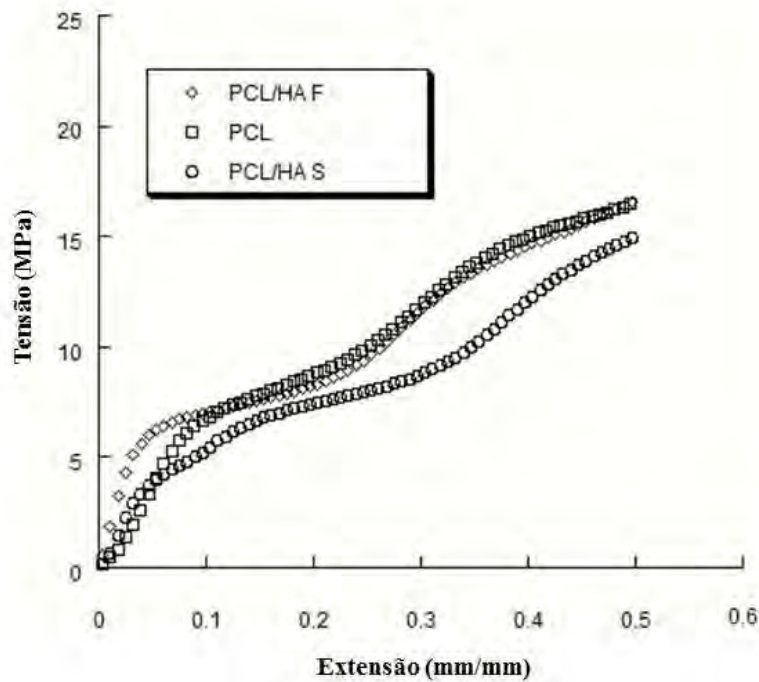
Os resultados obtidos permitem ainda verificar que a utilização de HA de maior granulometria permite uma maior percentagem de carregamento (19,2% em massa no caso de *scaffolds* PCL\_HA\_F e 15,62% em *scaffolds* PCL\_HA\_S). Tal pode ser devido ao facto de com o aumento da granulometria, as partículas tornam-se mais pesadas e por consequência mais fáceis de serem transferidas sem sofrerem perdas substanciais ao longo do processo. Relativamente à temperatura de início de degradação ( $T_D$ ) verificou-se que todas as amostras apresentam valores muito similares ( $\sim 315^\circ\text{C}$ ) excepto os *scaffolds* PCL\_HA\_F. A diminuição da temperatura de degradação ( $\sim 200^\circ\text{C}$ ) pode estar relacionada com algum agente químico utilizado pelo fornecedor aquando da preparação da HA.

Apesar das perdas verificadas ao longo do processo, as misturas apresentam percentagens de HA muito constantes, o que revela uma boa homogeneidade da mistura.

### ***Análises mecânicas***

O comportamento mecânico das estruturas 3D foi avaliado à compressão, em estado seco, a uma taxa de compressão de 1 mm/min até uma extensão máxima de 0,5 mm/mm. O principal objectivo destes testes foi determinar a influência da adição de HA às matrizes de PCL bem como o efeito da granulometria da HA nas propriedades mecânicas dos *scaffolds*. Todas as amostras testadas apresentavam dimensões externas iguais com comprimento ( $c$ ), largura ( $l$ ) e altura ( $h$ ) de 5 mm, 5 mm e 8 mm respectivamente. As estruturas testadas possuíam a mesma arquitectura interna, com poros de geometria quadrada totalmente interconectados, e uma porosidade de 58%. As curvas de tensão/extensão obtidas para os *scaffolds* de PCL e PCL/HA encontram-se ilustradas na Figura 6.12. Estas curvas demonstram claramente o efeito da adição de

HA às matrizes de PCL bem como a influência da granulometria dos fosfatos de cálcio no comportamento mecânico das estruturas.



**Figura 6.12:** Efeito da adição e variação da granulometria das partículas de HA no comportamento mecânico dos scaffolds 3D. Curvas de tensão/extensão obtidas a partir da compressão de scaffolds produzidos com ângulo de deposição e FD constantes de 0/90° e 750 µm, respectivamente.

As curvas representadas na Figura 6.12 são muito similares às curvas obtidas para os scaffolds de PCL com diferentes geometrias e dimensões de poros (Ver Capítulo 5), sendo também possível distinguir três zonas com comportamentos mecânicos distintos: existência de uma região linear elástica (elevada resistência) seguida de uma região plástica (menor resistência) e finalmente uma região de densificação (elevada resistência). O comportamento dos scaffolds compósitos volta a apresentar características muito semelhantes ao das espumas flexíveis com exceção da ausência de um patamar na região plástica. O módulo elástico aparente ( $E'$ ) foi calculado com

base no declive da curva da região linear elástica. Os valores do módulo elástico bem como da tensão máxima de compressão são indicados na Tabela 6.5.

**Tabela 6.5:** Efeito da adição e granulometria de HA nas propriedades mecânicas dos scaffolds compósitos à base de PCL.

<i>Scaffold</i>	Módulo elástico aparente E' (MPa)	Tensão máxima $\sigma_{max}$ (MPa)
PCL	105.5 ± 11.2	16.5 ± 1.4
PCL_HA_S	119.3 ± 13.1	14.7 ± 1.1
PCL_HA_F	219.6 ± 26.5	18.4 ± 1.2

Os resultados obtidos mostram que a adição de HA aumenta significativamente as propriedades mecânicas das estruturas, nomeadamente o módulo elástico aparente (E'). A adição de 25% em massa de HA promove o aumento do E' dos scaffolds de PCL que passa de 105.5 ± 11.2 MPa para 119.3 ± 13.1 no caso dos scaffolds de PCL\_HA\_S e 219.6 ± 26.5 nos scaffolds de PCL\_HA\_F. Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde se justifica o aumento das propriedades mecânicas das estruturas compósitas com a excelente resistência à compressão dos materiais cerâmicos [385, 389-391]. É ainda possível observar-se que os scaffolds de PCL\_HA\_F possuem um maior E' comparativamente com os scaffolds de PCL\_HA\_S. Teoricamente seria expectável que a distribuição mais homogênea das nano partículas de HA nos scaffolds de PCL\_HA\_S bem como a sua dimensão, promovessem o aumento da resistência mecânica no domínio elástico [392-393]. Contudo, os resultados obtidos demonstram o efeito contrário. Uma possível explicação para este facto reside nas diferenças de percentagens reais de HA presentes nos scaffolds de PCL\_HA\_S (15,62%) e PCL\_HA\_F (19,2%), e que podem ter ofuscado o efeito real da granulometria dos fosfatos de cálcio (ver Figura 6.11). Relativamente às tensões máximas de compressão verificou-se que os scaffolds de PCL\_HA\_F apresentam valores ligeiramente superiores (18.4 ± 1.2) quando comparados com os scaffolds de PCL (16.5 ± 1.4) e PCL\_HA\_S (14.7 ± 1.1). Esta ligeira superioridade pode ser justificada pela maior percentagem de HA. No entanto é importante realçar o esbatimento da diferença ao nível das tensões máximas de

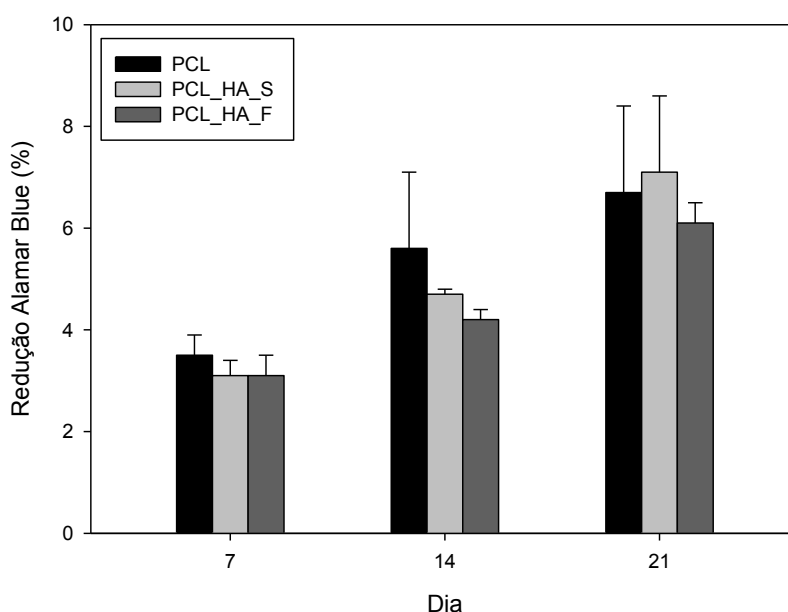
compressão entre os *scaffolds* contendo micro e nano partículas de HA bem como o facto da resistência mecânica dos *scaffolds* de PCL\_HA\_S ser inferior à resistência dos *scaffolds* de PCL. Tal pode estar relacionado com o facto de não existir uma ligação química efectiva entre as partículas de HA e o polímero (PCL), tal como existe entre a fase mineral do osso e o colagénio (através de ligantes carboxílicos), conduzindo deste modo a uma diminuição da resistência mecânica das estruturas [394]. Adicionalmente, a descontinuidade existente na matriz polimérica (PCL) devido à introdução das partículas de HA pode ter levado à criação de zonas de tensão localizadas que conduziram à redução da tensão máxima de compressão.

***Análises biológicas – Adesão, proliferação e diferenciação celular***

O *design*/produção de *scaffolds* para regeneração óssea envolve múltiplos factores de origem química, mecânica e biológica que devem ser devidamente analisados de forma a obter *scaffolds* com propriedades biomecânicas adequadas, capazes de proporcionar o correcto crescimento tecidual. Tal como verificado no Capítulo 5, a dimensão e geometria dos poros, conjuntamente com a interconectividade dos canais internos desempenham um papel crucial no processo de regeneração tecidual, assegurando a manutenção de um ambiente biomecânico adequado para a adesão e diferenciação das células bem como para a criação do sistema de vascularização. No entanto, estes requisitos por si só são insuficientes para garantir o sucesso dos bioimplantes à base de PCL. Isto deve-se à baixa bioactividade que o material possui e que limita consideravelmente a capacidade das estruturas em recrutar células dos tecidos adjacentes (quando implantadas *in vivo*), bem como de promover a adesão, proliferação e diferenciação celular *in vitro*. Por estes motivos, a produção de *scaffolds* compósitos bifásicos onde se combinam as boas propriedades mecânicas dos polímeros com a excelente bioactividade dos cerâmicos tem vindo a ganhar enorme importância. Apesar de tudo, poucos estudos têm dedicado a devida atenção ao efeito da granulometria dos fosfatos de cálcio no comportamento biomecânico dos implantes 3D.

Neste sentido procedeu-se à realização de análises biológicas com o objectivo de determinar quantitativamente e qualitativamente, o efeito da adição de HA bem como da sua granulometria no comportamento biológico de células hMSC. Para tal, foram

depositadas iguais densidades de células hMSC ( $17 \times 10^3$ ) directamente sobre os *scaffolds* (independentemente da sua composição) e colocados em cultura estática durante um período total de 21 dias. Em intervalos de tempo pré-determinados de 7, 14 e 21 dias, as estruturas foram retiradas da incubadora e analisadas relativamente à adesão, proliferação e diferenciação celular. Os resultados quantitativos de viabilidade e proliferação realizados com recurso ao método Alamar Blue™ são indicados na Figura 6.13.

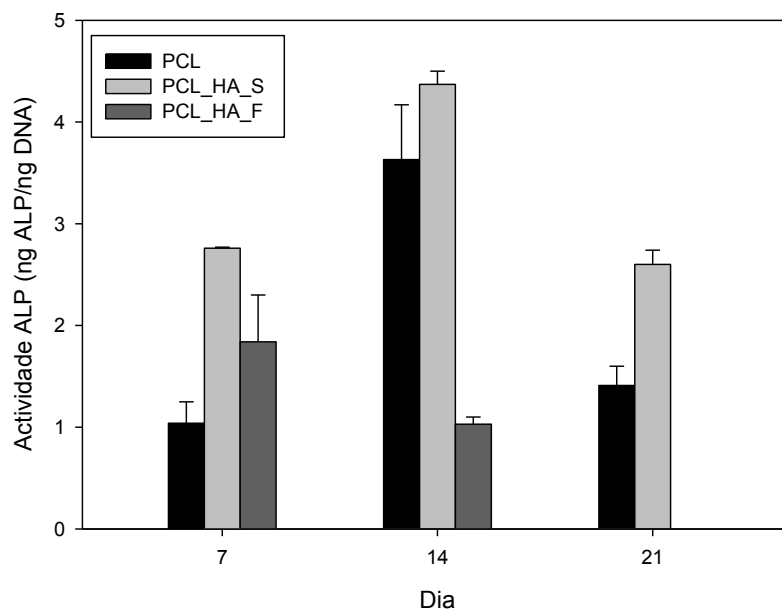


**Figura 6.13:** Percentagem de redução de Alamar Blue™ em função da presença e granulometria de HA.

Os resultados obtidos demonstram a capacidade que todas as estruturas analisadas possuem em promover a viabilidade e proliferação de hMSC ao longo do período de incubação. Comparando os valores de redução de Alamar Blue (21º dia) obtidos para os *scaffolds* de PCL e PCL\_HA\_S, não nos é possível afirmar que a presença de HA aumente de forma clara o nível de viabilidade e proliferação celular. Resultados semelhantes foram obtidos e reportados por Shor [390], que não detectou diferenças significativas ao nível da proliferação celular de osteoblastos bovinos depositados e cultivados em *scaffolds* de PCL e PCL/HA (25% de HA em massa). Já no que se refere à granulometria das partículas de HA, e no mesmo período (21º dia), é possível verificar

que os *scaffolds* contendo nano partículas de HA apresentam uma maior proliferação celular comparativamente com os *scaffolds* contendo micro partículas de HA. Este comportamento pode estar relacionado com a topografia superficial das estruturas. Tal como verificado nas imagens SEM, os *scaffolds* PCL\_HA\_F apresentam a formação de aglomerados de HA de dimensões elevadas na superfície dos filamentos, que podem impedir o estabelecimento de ligações intercelulares e consequente a proliferação celular.

A actividade osteogénica das células hMSC foi determinada quantitativamente através da medição da actividade da Alcalina Fosfatase (ALP). Os resultados obtidos para as diferentes estruturas em períodos de 7, 14 e 21 dias encontram-se representados na Figura 6.14.



**Figura 6.14:** Actividade da ALP relativa às células hMSC depositadas em *scaffolds* de PCL, PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F e cultivadas ao longo de 21 dias. Os dados encontram-se reportados na forma de valor médio  $\pm$  desvio padrão e normalizados por ng de DNA.

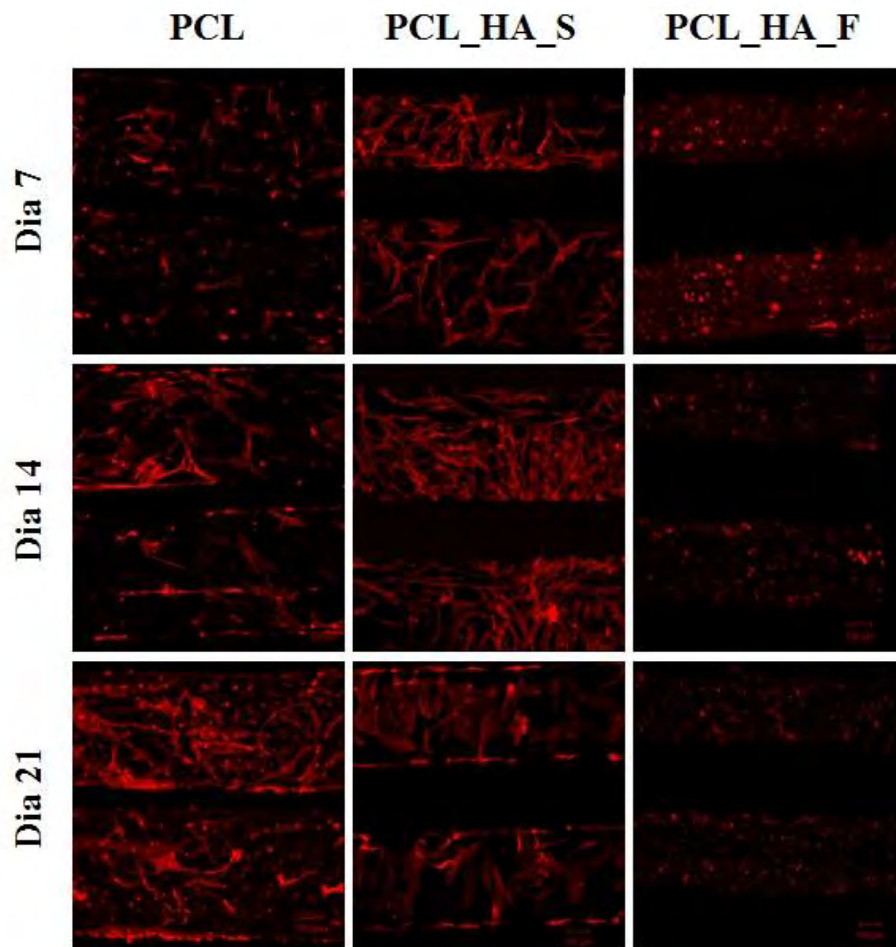
Os resultados obtidos confirmam a capacidade de todas as estruturas em promover a diferenciação osteogénica das hMSC ao longo do período de incubação. A actividade da ALP aumenta durante os primeiros 14 dias sofrendo de seguida uma quebra acentuada, relacionada com a deposição de uma matriz mineral por parte das células.

*Capítulo 6 - Desenvolvimento de scaffolds bioactivos à base de Policaprolactona e Hidroxiapatita.*

Adicionalmente é ainda possível observar que a introdução de nano partículas de HA (PCL\_HA\_S) promove um aumento significativo da diferenciação celular comparativamente com os *scaffolds* de PCL. É ainda possível verificar-se que os *scaffolds* PCL\_HA\_F apresentam uma capacidade de promover a diferenciação celular substancialmente inferior aos restantes *scaffolds*. De facto, apesar de teoricamente a HA ser um agente bioactivo com propriedades osteocondutoras, osteoindutivas e osteocondutivas, a sua granulometria pode promover efeitos completamente adversos. Neste caso em concreto, a elevada granulometria das partículas de HA presentes nos *scaffolds* de PCL\_HA\_F parece ter impedido o estabelecimento de conexões entre células vizinhas e deste modo inibido a diferenciação osteogénica das hMSC.

A morfologia celular bem como a sua variação temporal foram analisadas através de microscopia confocal a laser (Figura 6.15). Os resultados qualitativos obtidos revelam uma evolução clara em termos de adesão celular ao longo do período de incubação (7, 14 e 21 dias). Adicionalmente é ainda possível visualizar o efeito da granulometria da HA na morfologia das hMSC que aderiram na superfície dos filamentos. Os resultados revelam igualmente uma diferença morfológica das células no 7º dia de incubação. Apesar do número não ser muito elevado, é possível observar que as células hMSC que aderiram nos filamentos dos *scaffolds* de PCL e PCL\_HA\_S já apresentam uma morfologia filamentar, com um número considerável de ramificações, enquanto nos *scaffolds* de PCL\_HA\_F as células possuem ainda uma geometria circular. Este facto revela uma maior capacidade dos *scaffolds* de PCL e PCL\_HA\_S de promover a adesão celular comparativamente aos *scaffolds* de PCL\_HA\_F. Do 7º para o 21º dia existe uma clara evolução morfológica das células, passível de ser correlacionada com os dados de proliferação celular (Alamar Blue) e com a topografia superficial. Os *scaffolds* de PCL\_HA\_S são os que apresentam um maior número de células com uma morfologia filamentar homogénea, comparativamente com os *scaffolds* de PCL e PCL\_HA\_F. Isto significa um aumento dos pontos de contacto *scaffold*-célula e célula-célula, com consequente aumento da adesão, proliferação e diferenciação celular (dados confirmados por Alamar Blue e ALP). Adicionalmente verifica-se que a morfologia das células presentes nos *scaffolds* contendo micro partículas de HA não evolui,

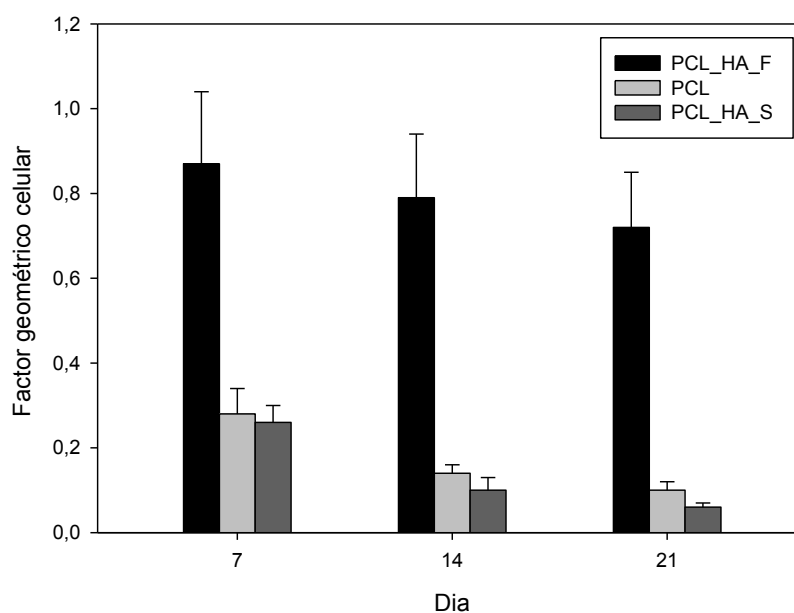
mantendo-se sempre circular (baixa adesão). Estas estruturas também não evidenciam contactos intercelulares suficientes para aumentar a proliferação e diferenciação osteogénica das células. É assim possível concluir-se que a topografia superficial, definida pela granulometria das partículas de HA tem um efeito relevante na morfologia celular. Os *scaffolds* contendo nano partículas de HA parecem apresentar uma topografia mais adequada à adesão, proliferação e diferenciação das células hMSC quando comparados com os *scaffolds* contendo micro partículas.



**Figura 6.15:** Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de estruturas *scaffold*/células. Nas imagens são evidenciados os filamentos de actina das células (colorados a vermelho por faloidina) que aderiram e proliferaram ao longo dos filamentos dos *scaffolds* de PCL, PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F. A barra de escala tem a dimensão de 100  $\mu\text{m}$ .



A partir das imagens de microscopia confocal foi ainda possível determinar o factor geométrico das células (ver Capítulo 5) para os dias 7, 14 e 21. Os valores obtidos são apresentados na Figura 6.16.



**Figura 6.16:** Factor geométrico celular calculado a partir de células depositadas em *scaffolds* de PCL, PCL\_HA\_S e PCL\_HA\_F com FD de 750  $\mu\text{m}$  e ângulo de deposição de 0/90°.

Os resultados obtidos indicam uma redução do valor do factor geométrico celular ao longo dos 21 dias de incubação independentemente da composição dos *scaffolds*. No entanto os *scaffolds* contendo nano partículas de HA são os que apresentam menor valor de factor geométrico celular comparativamente com as outras duas estruturas. Isto significa um aumento do grau de adesão das células, e por consequência da área de adesão celular. Estes resultados confirmam as análises morfológicas efectuadas (ver Figura 6.15).

## **6.4 – Sumário**

A crescente utilização de fosfatos de cálcio na produção de implantes bifásicos para regeneração óssea requer a realização de estudos sistemáticos que nos permitam determinar com precisão as vias através das quais estes materiais cerâmicos influenciam/alteram o comportamento biológico e mecânico dos dispositivos médicos. Neste Capítulo avaliou-se da adição de nano e micro partículas de HA em *scaffolds* de PCL. O sistema BioCell Printing, descrito no Capítulo 4 foi utilizado com sucesso para a produção de *scaffolds* caracterizados por uma rede interna de canais quadrangulares 100% interconectados, geometria externa bem definida e elevada estabilidade estrutural. Os *scaffolds* bifásicos (PCL/HA) produzidos apresentam elevado potencial mecânico e biológico para aplicação em engenharia de tecido ósseo. Assumindo um compromisso entre as propriedades mecânicas e biológicas, os resultados obtidos permitem concluir que os *scaffolds* contendo nano partículas de HA são de facto sérios candidatos para passar à fase de testes *in vivo* e futuramente aplicação clínica.

## Capítulo 7 – Conclusões e trabalhos futuros

---

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões relativas aos resultados obtidos neste trabalho de investigação, bem como perspectivas e recomendações para trabalhos futuros.

### 7.1 – Conclusões

O principal objectivo deste trabalho de investigação consistiu no *design* e produção de *scaffolds* bioactivos para regeneração de tecido ósseo. Para tal foi projectado e concebido um novo sistema de fabricação aditiva multimaterial denominado BioCell Printing. Os *scaffolds* produzidos através deste sistema de extrusão foram caracterizados do ponto de vista químico, morfológico, mecânico e biológico de modo a determinar o efeito dos parâmetros de *design* (dimensão e geometria dos poros) e do material sobre as propriedades biomecânicas das estruturas produzidas. As conclusões finais deste trabalho são de seguida reportadas de acordo com os objectivos indicados no Capítulo 1.

O conceito fundamental subjacente à ET prevê a combinação de um *scaffold* incorporando células ou moléculas biologicamente activas de modo a obter-se um bioimplante capaz de promover a reparação e/ou regeneração de tecidos e órgãos. Da matriz de suporte é esperado o cumprimento de diversas funções, nomeadamente a capacidade de suportar a adesão, proliferação e diferenciação celular. Deste modo, o *design* de *scaffolds* para ET em geral e para regeneração óssea em particular, deve contemplar inúmeros requisitos de origem química, mecânica e biológica. A quantidade e diversidade desses mesmos requisitos aumentam de forma substancial a complexidade associada à tarefa de produção de *scaffolds*. De forma a reduzir essa mesma complexidade, têm vindo a ser desenvolvidas e implementadas em ET diferentes tecnologias de fabricação aditiva capazes de produzir estruturas com elevada definição geométrica. Actualmente é possível obter *scaffolds* anatómicos através da combinação de sistemas de CAD, imagiologia médica e sistemas avançados de fabricação aditiva. Conjuntamente com os avanços verificados ao nível dos

biomateriais, a possibilidade de fabricar *scaffolds* de forma automática, manipulando e prevendo as suas propriedades físicas, tem-se tornado uma área de rápido crescimento e objecto de grande atenção por parte comunidade científica.

Deste modo, ao longo do Capítulo 2 procedeu-se a uma revisão detalhada da biologia do osso bem como das vantagens/desvantagens das actuais terapêuticas clínicas aplicadas no tratamento de defeitos e lesões ósseas. O potencial da ET e em especial da aplicação de *scaffolds* em conjunto com células para regeneração óssea foi reportado, evidenciando os diferentes requisitos que estas estruturas devem possuir. As diferentes tecnologias de fabricação aditiva, nomeadamente aquelas desenvolvidas especificamente para ET foram revistas e descritas em detalhe (ver Capítulo 2), demonstrando as suas vantagens e desvantagens de acordo com os materiais a processar e tecido/órgão a regenerar. Das diferentes classes de biomateriais utilizadas em ET, foi dada especial atenção aos polímeros sintéticos e materiais cerâmicos, nomeadamente PCL e HA (ver Capítulo 3). Estes são materiais aprovadas pela FDA que quando conjugados na forma de compósitos bifásicos (orgânico-inorgânico) apresentam propriedades mecânicas, biológicas e bioactivas superiores a outros materiais frequentemente utilizados em engenharia de tecido ósseo.

No Capítulo 4 descreve-se o trabalho efectuado ao nível do desenvolvimento e validação do sistema de biofabricação aditiva multimaterial, baseado no princípio da extrusão. Este sistema foi concebido de modo a ser constituído por quatro zonas de operação distintas onde, de forma sequencial, é realizada a produção de *scaffolds* (zona 1), esterilização (zona 2), deposição celular (zona 3) e cultura celular dinâmica *in vitro* (zona 4). Com excepção da zona 4, que será objecto de trabalhos futuros, todas as restantes zonas foram devidamente projectadas e implementadas. O sistema concebido no âmbito deste trabalho de investigação permite assim a integração das fases de pré e pós processamento de *scaffolds*, reduzindo os riscos de contaminação associados à transferência das estruturas entre sistemas, diminuindo os erros do operador e os tempos de produção, aumentando desta forma as possibilidades de transferência das tecnologias e produtos da fase laboratorial para a aplicação clínica. O sistema foi validado através da produção e subsequente análise morfológica de diferentes estruturas poliméricas em PCL. Os resultados obtidos permitiram-nos

confirmar o elevado potencial do sistema de fabricação aditiva para produção de *scaffolds* com elevada precisão dimensional e estabilidade estrutural bem como a grande flexibilidade geométrica que proporciona.

No Capítulo 5 descreve-se o estudo efectuado sobre a influência da dimensão e geometria dos poros no comportamento biomecânico de *scaffolds* em PCL produzidos pelo sistema BioCell Printing. Através da variação das distâncias entre filamentos (FD) e ângulos de deposição foi possível obter-se *scaffolds* com diferentes porosidades e arquitecturas de poros. Estas estruturas foram posteriormente testadas mecanicamente e os resultados obtidos permitiram retirar as seguintes conclusões:

- A resistência mecânica dos *scaffolds* depende directamente do nível de porosidade das estruturas. Aumentando o valor de FD e conseqüentemente a porosidade reduz-se o módulo elástico aparente ( $E'$ ) e a tensão máxima de compressão ( $\sigma_{Max}$ ).
- O aumento do número de ângulos de deposição resulta na diminuição das propriedades mecânicas das estruturas produzidas. Este facto está directamente relacionado com o aumento da área de fusão entre filamentos de camadas adjacentes (aumento dos planos de tensão) e conseqüente redução da resistência mecânica dos *scaffolds*. Deste modo, as estruturas com ângulo de deposição de  $0/90^\circ$  (poros quadrados) são as que apresentam melhores propriedades mecânicas.

Foram também efectuadas análises biológicas quantitativas e qualitativas utilizando células estaminais mesenquimais humanas (hMSC). Do ponto de vista da proliferação celular os *scaffolds* com maior dimensão de poro (FD=750  $\mu\text{m}$ ) e menor complexidade geométrica ( $0/90^\circ$ ) são os que apresentam melhores resultados. Contudo, no que concerne à diferenciação osteogénica os resultados obtidos são completamente opostos. Efectivamente, os resultados mostram que a diminuição da porosidade e o aumento da complexidade geométrica promovem o aumento do contacto célula-célula conduzindo a uma maior diferenciação celular em detrimento da proliferação e migração. A morfologia celular apresentou alterações significativas

ao longo do período de incubação sendo que não foram detectadas diferenças assinaláveis entre as diferentes estruturas.

Com base nos resultados obtidos no Capítulo 5 foram desenvolvidas metodologias para preparação e produção de *scaffolds* compósitos bioactivos à base de HA (25% em massa de HA) para regeneração óssea. O principal objectivo do trabalho passou por determinar o efeito da adição da HA e sua granulometria nas propriedades mecânicas e biológicas dos *scaffold*. As análises de TGA revelaram contudo que o método de preparação das misturas (*melt blending*) necessita ainda de ser optimizado. No entanto este processo apresenta algumas vantagens importantes relativamente a outros processos normalmente utilizados (por exemplo *solvent casting*), nomeadamente a ausência de solventes orgânicos tóxicos, simplicidade do processo, baixo tempo de produção e possibilidade de *upscale* para um ambiente industrial. Apesar das quantidades teóricas não corresponderem às quantidades reais de HA presentes nas misturas, os resultados de SEM permitiram confirmar uma distribuição muito homogénea das partículas cerâmicas à superfície e no interior dos filamentos dos *scaffolds*. As micrografias obtidas possibilitaram ainda observar uma distribuição mais fina (sem aglomerados) das nano partículas de HA nas matrizes de PCL comparativamente com as micro partículas de HA. Os testes mecânicos realizados em compressão permitiram confirmar que a adição de HA aumenta consideravelmente a resistência mecânica das estruturas produzidas. Contudo, relativamente ao efeito da granulometria no comportamento mecânico dos *scaffolds*, não foi possível retirar conclusões definitivas visto a quantidade de nano e micro partículas de HA presentes nas amostras ser consideravelmente diferente. Futuramente, o processo de preparação de misturas deverá ser objecto de melhoramento de modo a obterem-se compósitos com igual percentagem de nano e micro partículas de HA, permitindo assim determinar-se assertivamente o efeito da granulometria dos fosfatos de cálcio na resistência mecânica dos *scaffolds*. Ainda no que respeita ao comportamento mecânico, os *scaffolds* compósitos apresentam valores de módulo elástico aparente e tensão máxima de compressão próximos do osso trabecular nativo o que permite validar do ponto de vista mecânico a sua utilização em engenharia de tecido ósseo.

Ao nível da proliferação celular os resultados obtidos por Alamar Blue indicam claramente que os *scaffolds* nano compósitos (*scaffolds* com nano partículas de HA) possuem uma capacidade muito superior de suportar a proliferação das células hMSC comparativamente com os *scaffolds* micro compósitos. A medição da actividade da ALP revelou uma maior capacidade de promoção da diferenciação osteogénica por parte dos *scaffolds* nano compósitos. Estes resultados, em conjugação com os dados relativos à morfologia celular, permitem concluir que, as micro partículas de HA depositadas na superfície dos filamentos dos *scaffolds*, inibem o estabelecimento de contactos entre as células conduzindo a uma diminuição da proliferação e diferenciação celular. Deste modo, é possível concluir que a adição de nano partículas de HA às matrizes de PCL é particularmente importante quer do ponto de vista mecânico quer do ponto de vista biológico, para aplicação em regeneração óssea.

## **7.2 – Trabalhos futuros**

Nos últimos anos temos assistido a um crescimento económico relacionado com o desenvolvimento e aplicação de novos produtos provenientes da ET. Diversos sistemas baseados no uso de *scaffolds* têm vindo a ser aplicados clinicamente com sucesso na regeneração de osso, pele e cartilagem.

No entanto, as terapêuticas baseadas no uso de *scaffolds* falharam em larga escala, quer de uma perspectiva económica quer clínica. Apesar de estes novos produtos apresentarem características semelhantes ou até mesmo superiores àqueles já existentes no mercado, a sua eficiência e eficácia não foram suficientes para justificarem os elevados custos de produção associados. O processo manual de deposição e cultura celular é altamente dependente do operador, semi-eficiente, moroso e como tal torna-se economicamente e logisticamente pouco viável para alcançar a fase de aplicação clínica à escala económica.

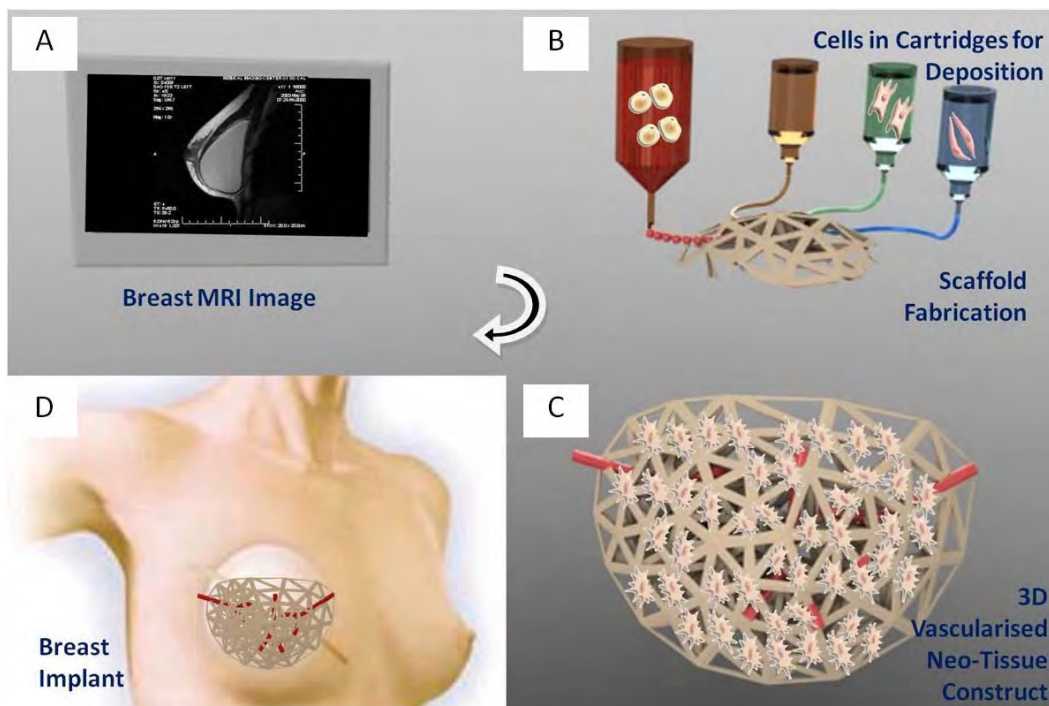
Algumas das desvantagens particulares do actual paradigma da ET estão relacionadas com:

- Processo de deposição celular dos *scaffolds*;
- Incapacidade de mimetizar a organização celular dos tecidos nativos;
- *Upscale* para aplicação clínica (economicamente viável);
- Resolução do problema da vascularização das estruturas;

As tecnologias de fabricação aditiva possuem a capacidade de resposta a estes requisitos através da incorporação de células no processo automático de produção. Deste modo, passa a ser possível a criação de estruturas orgânicas compostas por células encapsuladas em matrizes poliméricas (Figura 7.1). A premissa fundamental desta nova metodologia assenta no facto da deposição espacial controlada de células ou agregados celulares (conjuntamente com a sua ME artificial) poder melhorar o processo de crescimento tecidual comparativamente com a utilização isolada de *scaffolds*. Esta técnica, denominada por bioimpressão ou impressão directa de órgãos (ver secção 2.4.2 – *Inkjet Printing*), apesar de ainda se encontrar numa fase muito inicial de desenvolvimento, parece apresentar um enorme potencial na criação de novas soluções clínicas a longo prazo, nomeadamente em áreas onde as técnicas baseadas no uso de *scaffolds* têm vindo a falhar.

Em termos de perspectivas futuras o sucesso da ET e dos respectivos produtos associados irá passar pela capacidade que os diversos grupos a nível mundial apresentarem ao nível do desenvolvimento de soluções para aplicação em duas grandes áreas, nomeadamente, convergência de técnicas/tecnologias e automação das fases de pré e pós-processamento de estruturas (*scaffolds*/matrizes).





**Figura 7.1:** Representação esquemática do princípio de fabricação aditiva de tecidos. a) MRI de um peito; b) Produção simultânea de *scaffold* (material termoplástico biodegradável) e deposição de células encapsuladas em hidrogéis: pré-adipócitos em ME artificial (gel biomimético) e células musculares em ME artificial (gel biomimético); c) sistema neo-tecido 3D produzido; d) Implante.

### ***Convergência de técnicas/tecnologias***

Todas as técnicas de fabricação aditiva possuem as suas vantagens e desvantagens específicas (Tabela 2.3, Capítulo 2), particularmente no que se refere ao processamento de determinados biomateriais. Até à data, e de uma forma geral, os engenheiros têm vindo a trabalhar no desenvolvimento de novos sistemas de fabricação aditiva capazes de processar a maior quantidade possível de biomateriais comercialmente disponíveis. Paradoxalmente, os investigadores no domínio dos materiais têm tentado desenvolver novos biomateriais capazes de serem utilizados pelos sistemas comerciais de fabricação aditiva. No futuro, é previsível e essencial que exista uma convergência de conhecimento e técnicas de forma a colocar a fabricação aditiva num nível superior.

Como exemplo, a combinação de um sistema de extrusão com um sistema estereolitográfico poderá vir a permitir a construção de estruturas à base de hidrogéis com ou sem encapsulamento de células com melhores propriedades estruturais e biológicas. De forma resumida, o sistema de extrusão, mais especificamente a cabeça de extrusão, poderia ter acoplado um sistema laser que permitisse de forma contínua a deposição automática de material e conseqüente reticulação do hidrogel. Desta forma poderia ser possível aumentar ou diminuir o grau de reticulação das matrizes poliméricas promovendo a variação localizada das propriedades mecânicas.

Uma outra possibilidade, está relacionada com modificações pós-processamento das estruturas, com vista à criação de canais internos em blocos de hidrogel através do uso de lasers. Estes canais poderiam servir para a perfusão do meio de cultura durante o processo de cultura celular ou então como sistemas de neovascularização. Este último poderia ser alcançado através da deposição ou co-cultura de células endoteliais e fibroblastos no interior das paredes dos canais.

O desenvolvimento de sistemas de fabricação híbridos poderá igualmente aumentar o potencial das tecnologias de fabricação aditiva, colmatando as desvantagens intrínsecas de cada tecnologia. Por exemplo, a combinação de técnicas de extrusão, capazes de produzir estruturas com elevada precisão à escala micrométrica, combinadas com técnicas de produção manométricas (*electrospinning*) podem vir a permitir a produção de *scaffolds* híbridos com características optimizadas em termos de proliferação e vascularização. Deste modo será possível produzir filamentos com ordem de grandeza micrométrica revestidos com nanofilamentos do mesmo material (ou de outro material diferente, com ou sem introdução de fármacos) de modo a aumentar a área superficial das estruturas e conseqüentemente a adesão e proliferação celular.

#### **Automação das fases de pré e pós-processamento**

Se o objectivo da produção automática de substitutos biológicos é promover a passagem da ET para uma fase de aplicação prática e clínica, então será importante que a fase de produção de *scaffolds* esteja integrada com a fase de deposição celular, tal como é proposto nesta dissertação, reduzindo-se deste modo a intervenção manual

do operador. É igualmente importante que, para além, da automatização de processos, os equipamentos conheçam um processo de upscale de modo a permitirem a sua utilização em ambiente clínico. Além da automação das fases antes mencionadas é também extremamente importante que a fase de cultura celular possa ser automatizada, para além de totalmente integrada com as duas fases anteriores (produção e deposição de células nos *scaffolds*).

Durante o trabalho de investigação desenvolvido foram abertas questões que importa ver respondidas através de trabalhos a realizar na sequência do presente estudo. Algumas das propostas visam dar resposta às exigências futuras de integração/convergência e automatização antes mencionadas. Assim, como trabalhos futuros deverá proceder-se à:

- Optimização do hardware e software da zona de fabricação do sistema BioCell Printing com o objectivo de produzir estruturas com gradiente funcionais através da deposição diferencial de materiais e manipulação de parâmetros de design;
- Integração e sincronização do dispositivo de fabricação aditiva multimaterial com todas as outras zonas de operação do sistema BioCell Printing;
- Extensão do estudo descrito no Capítulo 5 através da utilização de diferentes materiais e linhas celulares de modo a alargar-se a janela de operação do sistema BioCell Printing. Este estudo permitirá igualmente, para uma gama mais alargada de materiais, definir matrizes de características mecânicas e biológicas de *scaffolds* função das suas características topológicas e das condições de processamento;
- Optimização do processo de obtenção de misturas compósitas bifásicas de forma a ser possível avaliar-se o efeito da granulometria das partículas de HA sobre o comportamento biomecânico das estruturas.
- Realização de estudos *in vivo* utilizando *scaffolds* nano compósitos (com HA ou TCP) com o objectivo de perceber o processo de remodelação óssea em função da percentagem de fosfatos de cálcio.

## Capítulo 7 – Conclusões e trabalhos futuros

- Produção de *scaffolds* 3D bioactivos que possam funcionar também como veículos para entrega controlada de fármacos. A este nível deverá ser explorada a afinidade química existente entre a HA e bisfosfanatos para produzir um sistema capaz de libertar, de forma controlada, um dos fármacos mais utilizados no tratamento da osteoporose.
- Extensão da utilização do sistema BioCell Printing ao processamento de hidrogéis poliméricos com células encapsuladas sem comprometer a vitalidade e expressão do fenótipo celular. Para tal, a zona de construção concebida no âmbito desta dissertação deverá ser ligeiramente modificada através do acoplamento de fibras ópticas às cabeças de extrusão que permitirão mecanismos adicionais de reticulação dos hidrogéis. A extrusão dos hidrogéis com células encapsuladas será efectuada através de um êmbolo accionado por um motor de passo. Este sistema pode vir a ter uma aplicação relevante na produção de estruturas biomiméticas para a regeneração da cartilagem.
- Produção de um bioreactor operando em modo dinâmico para acoplamento ao sistema BioCell Printing e desenvolvimento de um software que permita o controlo de parâmetros como, fluxo de meio de cultura, O<sub>2</sub>, estímulos mecânicos, etc.

## Capítulo 8 - Referências

---

- [1] Unos, 2012. <http://www.unos.org/>. Acedido em 17/02/2012.
- [2] Porter, J.R., Ruckh, T.T. and Popat, K.C., 2009. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress*. 25(6), 1539-1560.
- [3] Kurtz, S.M., Ong, K.L., Schmier, J., Mowat, F., Saleh, K., Dybvik, E., Karrholm, J., Garellick, G., Havelin, L.I., Furnes, O., Malchau, H. and Lau, E., 2007. Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*. 89(3),144–151.
- [4] Sommerfeldt, D.W., and Rubin, C.T., 2001. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*. 10(2), 86-95.
- [5] Rodan, G.A., 1992. Introduction to bone biology. *Bone*. 13(1), 3-6.
- [6] Baron, R., 1993. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Favus M, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. New York: Raven Press. 3-9.
- [7] Yaszemski, M.J., Payne, R.G., Hayes, W.C., Langer, R. and Mikos, A.G., 1996. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*. 17(2), 175-185.
- [8] Glimcher, M.J. and Krane, S.M., 1968. The organization and structure of bone and the mechanism of calcification. In: Ramachandran GN and Goudl BS, eds. *A Treatise on Collagen. Biology of Collagens*, 2B. New York: Academic Press. 68-91.
- [9] Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S., Mikos A.G., 2001. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*. 22(19), 2581-2593.

## Capítulo 8 -Referências

- [10] Hill, P.A. and Orth, M., 1998. Bone remodelling. *British Journal of Orthodontics*. 25(2), 101-107.
- [11] Temenoff, J.S., Lu, L. and Mikos, A.G., 2000. Bone tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds. In: Davies JE, ed. *Bone Engineering*. Toronto: University of Toronto. 454-461.
- [12] Aubin, J. E. and Triffitt, J.T., (2002). Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press. 59-81.
- [13] Ducey, P., Schinke, T. and Karsenty, G., 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 289(5484), 1501-1504.
- [14] Mackie, E.J., 2003. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35(9), 1301-1305.
- [15] Nijweide, P.J., Burger, E H. and Nulend, J.K., 2002. The osteocyte. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press. 93-107.
- [16] Vaananen, H.K. and Zhao, H., 2008. Osteoclast function: biology and mechanisms. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Martin TJ, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press. 193-210.
- [17] Watkins, B.A., Lippman, B.E., Le Bouteiller, L., Li, Y. and Seifert, M.F., 2001. Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. *Progress in Lipid Research*. 40(1-2), 125-148.
- [18] Owen, M., and Ashton, B., 1986. Osteogenic differentiation of skeletal cell populations. In: Ali SY, ed. *Cell mediated calcification and matrix vesicles*. Amsterdam: Elsevier. 279-284.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [19] Skerry, T.M., Bitensky, L., Chayen, J. and Lanyon, L.E., 1989. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following loading in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*. 4(5), 783-788.
- [20] Baron, R., 1989. Molecular mechanisms of bone resorption by osteoclast. *The Anatomical Record*. 224(2), 317-324.
- [21] Rossert, J. and De Crombrughe, B., 2002. Type I collagen: Structure, synthesis and regulation. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press. 189-210.
- [22] Triffitt, J.T., 1996. The stem cell of the osteoblast. In: Bilezikian JP and Raisz LG, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press. 39-50.
- [23] Termine, J.D., 1993. Bone Matrix proteins and the mineralization process. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism 2nd Ed*. New York: Raven Press. 21-25.
- [24] Robey, P.G. 2002. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press. 225-237.
- [25] Sodek, J., Ganss, B. and McKee, M.D., 2000. Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 11(3), 279-303.
- [26] Boskey, A.L., 2006. Structure and metabolism of the extracellular matrix of bone and cartilage. In: Seibel MJ, Robins SP and Bilezikian JP, Eds. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. San Diego: Academic Press. 199-212.
- [27] Sodek, J., and Cheifetz, S. (1999). Molecular Regulation of Osteogenesis. In: Davies JE, ed. *Bone Engineering*. Toronto: University of Toronto. 31-43.

## Capítulo 8 -Referências

- [28] Butler, W.T., Ridall, A.L., and McKee, M.D. 1996. Osteopontin. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology. San Diego: Academic Press. 167-181.
- [29] Davies, J.E., 1996. In vitro modeling of the bone/implant interface. The Anatomical Record. 245(2), 426-445.
- [30] Davies, J.E., 1998. Mechanisms of endosseous integration. The International Journal of Prosthodontics. 11(5), 391-401.
- [31] Davies, J.E. and Baldan, N., 1997. Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 36(4), 429-440.
- [32] Marks Jr., S.C., and Hermey, D.C. (1996). The structure and development of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology. San Diego: Academic Press. 3-34.
- [33] Weiner, S. and Wagner, H.D., 1998. The material bone: structure-mechanical function relations. Annual Review of Materials Science. 28, 271-298.
- [34] Weiner, S., Traub, W. and Wagner, H.D., 1999. Lamellar bone: structure–function relations. Journal of Structural Biology. 126(3), 241-255.
- [35] Doblaré, M., Garcia, J.M. and Gomez, M.J., 2004. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. Engineering Fracture Mechanics. 71(13-14), 1809-1840.
- [36] Yaszemski, M. J., Oldham, J. B., Lu, L., and Currier, B. L. 2000. Clinical needs for bone tissue engineering technology. In. Davies JE, ed. Bone Engineering. Toronto: University of Toronto. 541-547.
- [37] Spitzer, R., Perka, C., Lindenhayn, K. and Zippel, H., 2002. Matrix engineering for osteogenic differentiation of rabbit periosteal cells using  $\alpha$ -tricalcium phosphate



## Capítulo 8 -Referências

particles in a three-dimensional fibrin culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 59(4), 690-696.

[38] Simon, G.C., Khatri, C.A., Wight, S.A. and Wang, F.W., 2002. Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Orthopaedic Research*. 20(3), 473-482.

[39] Rose, F. R. and Oreffo, R.O. (2002). Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 292(1), 1-7.

[40] Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L. and Guillemin, G., 2000. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotechnology*. 18(9), 959-963.

[41] Seto, I., Asahina, I., Oda, M. and Enomoto, S., 2001. Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 59(1), 53-61.

[42] Finkemeier, C.G., 2002. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 84(3), 454-464.

[43] Perry, C.R., 1999. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 360, 71-86.

[44] Williams, D.F., 2000. Perspectives on the contributions of biomaterials and tissue engineering to bone repair, reconstruction and regeneration. In: Davies JE, ed. *Bone Engineering*. Toronto: University of Toronto. 577-584.

[45] Wikipédia, 2009. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:RightFemurV.JPG>. Acedido em 17/02/2012

[46] Alaortho, 2011. <http://www.alaortho.com/indBigEng.htm>. Acedido em 17/02/2012.

## Capítulo 8 -Referências

- [47] Khan, S.N., Tomin, E. and Lane, J.M., 2000. Clinical applications of bone graft substitutes. *The Orthopedic Clinics of North America*. 31(3), 389-398.
- [48] Kasios, 2011. [http://www.kasios.com/duowedge\\_gb.html](http://www.kasios.com/duowedge_gb.html). Acedido em 17/02/2012.
- [49] Daar, A.S. and Greenwood, H., 2007. A proposed definition of regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 1, 179-184.
- [50] Langer, R. and Vacanti, J.P., 1993. *Tissue Engineering*. Science. 260, 920-926.
- [51] Stock, U.A. and Vacanti, J.P., 2001. Tissue engineering: current state and prospects. *Annual Review of Medicine*. 52, 443-451.
- [52] Domingos, M., Dinucci, D., Cometa, S., Alderighi, M., Bartolo, P.J. and Chiellini, F., 2009. Polycaprolactone scaffolds fabricated via bioextrusion for tissue engineering applications. *International Journal of Biomaterials*. Volume 2009, Article ID 239643, 9 pages.
- [53] Lee, Soo-Hong. and Shin, H., 2007. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59(4-5), 339–359.
- [54] Bártolo, P.J., Almeida, H., Rezende, R., Laoui, T. and Bidanda, B., 2008. Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering. In: Bidanda B and Bártolo PJ, eds. *Virtual Prototyping & Bio-Manufacturing in Medical Applications*. New York: Springer. 149-170.
- [55] Hoque, M.E., Feng, W., Wong, Y.S., Hutmacher, D.W., Li, S., Huang, M.H., Vert, M. and Bártolo, P.J., 2008. Scaffolds designed and fabricated with elastic biomaterials applying CAD-CAM technique. *Tissue Engineering Part A*. 14(5), 907.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [56] Rath, S.N., Cohn, D. and Hutmacher, D.W., 2008. Comparison of chondrogenesis in static and dynamic environment using a SFF designed & fabricated PCL-PEO scaffold. *Virtual and Physical Prototyping*. 3(4), 209-219.
- [57] Hutmacher, D.W., 2001. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues – state of the art and future perspective. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 12(1), 107-124.
- [58] Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F., Tan, K.C. and Lim, T.C., 2007. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 1(4), 245-260.
- [59] Rouwkema, J., Rivron, N.C. and van Blitterswijk, C.A., 2008. Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*. 26(8), 434-441.
- [60] Jones, A.C., Arns, C.H., Hutmacher, D.W., Milthorpe, B.K., Sheppard, A.P. and Knackstedt, M.A., 2009. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials*. 30(7), 1440-1451.
- [61] Hollister, S.J., Maddox, R.D. and Taboas, J.M., 2002. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials*. 23(20). 4095-4103.
- [62] Lee, J., Cuddihy, M.J. and Kotov, N.A., 2008. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Engineering Part B*. 14(1), 61-86.
- [63] Leong, K.F., Chua, C.K., Sudarmadji, N. and Yeong, W.Y., 2008. Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*. 1(2), 140–152.
- [64] Oh, S.H., Park, I.K., Kim, J.M. and Lee, J.H., 2007. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*. 28 (9), 1664-1671.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [65] Yang, S.F., Leong, K.F., Du, Z.H. and Chua, C.K., 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part 1, traditional factors. *Tissue Engineering*. 7(6). 679–689.
- [66] Wang, H., Pieper, J., Péters, F., Blitterswijk, C.A.v. and Lamme, E.N., 2005. Synthetic scaffold morphology controls human dermal connective tissue formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 74A, 523–532.
- [67] Sachlos, E. and Czernuske, J.T., 2003. Making tissue engineering scaffold work: review on the application of SFF technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*. 5, 29–40.
- [68] Peltola, S.M., Melchels, F.P.W., Grijpma, D.K. and Kellomäki, M., 2008. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of Medicine*. 40(4), 268–280.
- [69] Gloria, A., Russo, T., De Santis, R. and Ambrosio, L., 2009. 3D fiber deposition technique to make multifunctional and tailor-made scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*. 7(3), 141-52.
- [70] Robinson, B.P., Hollinger, J.O., Szachowicz, E.H. and Brekke, J., 1995. Calvarial bone repair with porous D,L-polylactide, *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 112(6), 707–713.
- [71] Pineda, L.M., Büsing, M., Meinig, R.P. and Gogolewski, S., 1996. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 31(3), 385–394.
- [72] Liu, D., 1996. Control of pore geometry on influencing the mechanical property of porous hydroxyapatite bioceramic. *Journal of Materials Science Letters*. 15(5), 419–421.
- [73] Chang, B.S., Lee, C.K., Hong, K.S. and Youn, H.J., 2000. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*. 21(12), 1291–1298.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [74] Jin, Q.M., Takita, H., Kohgo, T., Atsumi, K., Itoh, H. and Kuboki, Y., 2000. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 51(3), 491–499.
- [75] Chu, T.M.G., 2006. Solid freeform fabrication of tissue engineering scaffolds. In: Ma PX and Elisseff J, eds. *Scaffolding in Tissue engineering*. Northwest Florida: Taylor and Francis. 139–153.
- [76] Bártolo, P.J., Chua, C.K., Almeida, H.A., Chou, S.M. and Lim, A.S.C., 2009. Biomanufacturing for tissue engineering: Present and future trends. *Virtual and Physical Prototyping*. 4(4), 203-216.
- [77] Gibson, I., 2006. Rapid prototyping: from product development to medicine and beyond. *Virtual and Physical Prototyping*, 1(1), 31-42.
- [78] Hutmacher, D.W., 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 21(24), 2529–2543.
- [79] Yang, S., Leong, K.F., Du, Z. and Chua, C.K., 2002. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Engineering*. 8(1), 1–11.
- [80] Chua, C.K., Leong, K.F. and Lim, C.S., 2003. Rapid prototyping process chain. In: Chua CK, Leong KF and Lim CS, eds. *Rapid prototyping–Principles and Applications*. Singapore: World Scientific Pub Co. 25–33.
- [81] Hull C., 1990. Method for production of three–dimensional objects by Stereolithography. US Patent 4929402.
- [82] Scott, C.S., 1991. Apparatus and method for creating three–dimensional objects. US Patent 5121329.
- [83] Brecht, J.F., Sach, E., Brancazio, D., Cima, M., Curodeau, A. and Fan, T., 1998. Three dimensional printing system. US Patent 5807437.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [84] Landers, R. and Mulhaupt, R., 2000. Desktop manufacturing of complex object, prototypes and biomedical scaffolds by means of computer-assisted design combined with computer-guided 3D plotting of polymers and reactive oligomers. *Macromolecular Materials and Engineering*. 282(1), 17–21.
- [85] Landers, R., Pfister, A., Hubner, U., John, H., Schmelzeisen R. and Mulhaupt, R., 2002a. Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques. *Journal of Materials Science*. 37(15), 3107–3116.
- [86] Landers, R., Hubner, U., Schmelzeisen, R. and Mulhaupt, R., 2002b. Rapid prototyping of scaffold derived from thermoreversible hydrogels and tailored for application in tissue engineering. *Biomaterials*. 23(23), 4437–4447.
- [87] Woodfield, T.B.F., Malda, J., de Wijn, J., Peters, F., Riesle, J. and Van Blitterswijk, C.A., 2004. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fibre-deposition technique. *Biomaterials*. 25(18), 4149–4161.
- [88] Malda, J., Woodfield, T.B. and van der Vloodt, F., 2004. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on the composition of tissue engineered cartilage. *Biomaterials*. 26(1). 63–72.
- [89] Moroni, L., de Wijn, J.R. and Van Blitterswijk, C.A., 2005. Three-dimensional fiber-deposited PEOT/PBT copolymer scaffolds for tissue engineering: influence of porosity, molecular network mesh size and swelling in aqueous media on dynamic mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 75(4), 957–965.
- [90] Moroni, L., de Wijn, J.R. and Van Blitterswijk, C.A., 2006a. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials*. 27(7), 974–985.
- [91] Moroni, L., Poort, G., van Keulen, F., de Wijn, J. and Van Blitterswijk, C.A., 2006b. Dynamic mechanical properties of 3D fiber-deposited PEOT/PBT scaffolds: an experimental and numerical analysis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 78(3), 605–614.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [92] Ma, P.X., 2007. Tissue Engineering. In: Mark HF, ed. Encyclopedia of Polymer Science and Technology: Concise Edition, 3<sup>rd</sup> Edition. New York: John Wiley & Sons. 1257-1261.
- [93] Freed, L.E., and Vunjak-Novakovic, G. (2000). Tissue engineering bioreactors. In: Vacanti JP, ed. Principles of Tissue Engineering, San Diego, CA: Academic, 143-156.
- [94] Martin, Y. and Vermette, P., 2005. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization and recent advances. Biomaterials. 26(35), 7481-7503.
- [95] Kneser, U., Schaefer, D.J., Munder, B., Klemt, C., Andree, C. and Stark, G.B., 2002. Tissue engineering of bone. Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies. 11(2), 107-116.
- [96] Holtorf, H.L., Jansen, J.A. and Mikos, A.G., 2006. Modulation of cell differentiation in bone tissue engineering constructs cultured in a bioreactor. Advances in Experimental Medicine and Biology. 585(4), 225-241.
- [97] Samuel, R.E., Lee, C.R., Ghivizzani, S., Evans, C.H., Yannas, I.V., Olsen B.R. and Spector M., 2002. Delivery of plasmid DNA to articular chondrocytes via novel collagen-glycosaminoglycan matrices. Human Gene Therapy. 13(7), 791-802.
- [98] Matsumoto, T. and Mooney, D.J., 2006. Cell instructive polymers. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 102, 113-137.
- [99] Sanz-Herrera, J.A., Garcia-Aznar, J.M. and Doblaré, M., 2009. On scaffold designing for bone regeneration: a computational multiscale approach. Acta Biomaterialia. 5(1), 219-229.
- [100] Hutmacher, D.W., 2004. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. Trends Biotechnology. 22(7), 354-362.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [101] Dalton, P.D., Woodfield, T. and Hutmacher, D.W., 2009. Snapshot: polymer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 30(4), 701–702.
- [102] Tibbitt, M.W. and Anseth, K.S., 2009. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 103(4), 655–663.
- [103] Hutmacher, D.W., Loessner, D., Rizzi, S., Kaplan, D.L., Mooney, D.J. and Clements, J.A., 2010. Can tissue engineering concepts advance tumor biology research?. *Trends in Biotechnology*. 28(3), 125-133.
- [104] Anderson, J.M., 1993. Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. *Cardiovascular Pathology*. 2(3), 33-41.
- [105] Anderson, J.M., 1988. Inflammatory response to implants. *ASAIO Transactions, American Society for Artificial Internal Organs*. 34(2), 101-107.
- [106] Anderson, J.M., 1998. Biocompatibility of tissue-engineered implants. In: Patrick CW, Mikos AG and McIntire LV, eds. *Frontiers in Tissue Engineering*. New York: Pergamon. 166-196.
- [107] Gilbert, T.W., Stewart-Akers, A.M. and Badylak, S.F., 2007. A quantitative method for evaluating the degradation of biologic scaffold materials. *Biomaterials*. 28(2), 147-150.
- [108] Sung, H.J., Meredith, C., Johnson, C. and Galis, Z.S., 2004. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials*. 25(26), 5735-5742.
- [109] Domingos, M., Chiellini, F., Cometa, S., Giglio, E.D., Grillo-Fernandes, E., Bartolo, P.J. and Chiellini, E., 2010. Evaluation of in vitro degradation of PCL scaffolds fabricated via BioExtrusion. Part 1: Influence of the degradation environment. *Virtual and Physical Prototyping*. 5(2), 1-9.



## *Capítulo 8 -Referências*

[110] Leon y Leon C., 1998. New perspectives in mercury porosimetry. *Advances in Colloid and Interface Science*. 76(77), 341-372.

[111] Kuboki, Y., Takita, H., Kobayashi, D., Tsuruga, E., Inoue, M. and Murata, M., 1998. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 39(2), 190–199.

[112] Story, B.J., Wagner, W.R., Gaisser, D.M., Cook, S.D. and Rust-Dawicki, A.M., 1998. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 13(6), 749–57.

[113] Mikos, A.G., Sarakinos, G., Lyman, M.D., Ingber, D.E., Vacanti, J.P. and Langer, R., 1993. Prevascularization of porous biodegradable polymers. *Biotechnology and Bioengineering*. 42, 716-723.

[114] Lawrence, B.J. and Madihally, S.V., 2008. Cell colonization in 3D degradable porous matrices. *Cell Adhesion & Migration*. 2(1), 9-16.

[115] Shihong, L.I., Wijn, J.R.D., Jiaping, L.I., Layrolle, P. and Groot K.D., 2003. Macroporous biphasic calcium phosphate scaffold with high permeability/porosity ratio. *Tissue Engineering*. 9(3), 535-548.

[116] O'Brien, F.G., Harley, B.A., Waller, M.A., Yannas, I.V., Gibson, L.J. and Prendergast P.J., 2007. The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. *Technology and Health Care*. 15(1), 3-17.

[117] O'Brien, F.G., Harley, B.A., Yannas, I.V. and Gibson L.J., 2005. Effect of pore size on cell adhesion in collagen-gag scaffolds. *Biomaterials*. 26(4), 433-441.

[118] Stevens, M.M., 2005. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*. 310, 1135-1138.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [119] Price, R.L., Ellison, K., Haberstroh, K.M. and Webster, T.J., 2004. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 70(1), 129-138.
- [120] Curtis, A.S.G., Gadegaard, N., Dalby, M.J., Riehle, M.O., Wilkinson, C.D.W. and Aitchison, G., 2004. Cells React to Nanoscale Order and Symmetry in Their Surroundings. *IEEE Transactions in Nanobioscience*. 3(1), 61-65.
- [121] Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D. and Schwartz, Z., 1996. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 17(2), 137-146.
- [122] McClary, K.B., Ugarova, T. and Grainger, D.W., 2000. Modulating fibroblast adhesion, spreading, and proliferation using self-assembled monolayer films of alkythiolates on gold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 50(3), 428-439.
- [123] Quirk, R.A., Chan, W.C., Davies, M.C., Tendler, S.J. and Shakesheff, M.K., 2001. Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid). *Biomaterials*. 22(8), 865-872.
- [124] Chu, P.K., Chen, J.Y., Wang, L.P. and Huang, N., 2002. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 36(5-6), 143-206.
- [125] Yildirim, E.D., Besunder, R., Guceri, S., Allen, F. and Sun, W., 2008. Fabrication and plasma treatment of 3D polycaprolactone tissue scaffolds for enhanced cellular function. *Virtual and Physical Prototyping*. 3(4), 199-207.
- [126] Rejeb, S.B., Tatoulian, M., Khonsari, F.A., Durand, F.A., Martel A. and Lawrence J.F., 1998. Functionalization of nitrocellulose membranes using ammonia plasma for the covalent attachment of antibodies for use in membrane-based immunoassays. *Analytica Chimica Acta*. 376(1), 133-138.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [127] Puleo, D. A., Kissling, R.A. and Sheu, M.S., 2002. A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials*. 23(9), 2079-2087.
- [128] Daw, R., O'Leary, T., Kelly, J., Short, R.D., Cambray-Deakin, M., Devlin, A.J., Brook, I.M., Scutt, A. and Kothari, S., 1999. Molecular engineering of surfaces by plasma copolymerization and enhanced cell attachment and spreading. *Plasmas and Polymers*. 4(2-3), 113-132.
- [129] Hsiue, G.H., Lee, S.D., Wang, C.C., Shiue, M.H.I. and Chang P.C.T., 1993. ppHEMA-modified silicone rubber film towards improving rabbit corneal epithelial cell attachment and growth. *Biomaterials*. 14(8), 591-597.
- [130] Sipehia, R., Martucci, G., Barbarosie, M. and Wu, C., 1993. Enhanced attachment and growth of human endothelial cells derived from umbilical veins on ammonia plasma modified surfaces of PTFE and ePTFE synthetic vascular graft biomaterials. *Biomaterials Artificial Cells and Immobilization Biotechnology*. 21(4), 455–68.
- [131] Siow, K.S., Brichter, L., Kumar, S. and Griesser, H.J., 2006. Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization. *Plasma Processes and Polymers*. 3(6-7), 392-418.
- [132] Favia, P., Sardella, E., Lopez, L.C., Laera, S., Milella, A., Pistillo, B.R., Intranuovo, F., Nardulli, M., Gristina, R. and d'Agostino, R., 2008. Plasma assisted surface modification processes for biomedical materials and devices. In: Guceri S and Fridman A, eds. *Plasma Assisted Decontamination of Biological and Chemical Agents*. NATO-Science for Peace and Security Series, 203–226.
- [133] Griesser, H.J., Chatelier, R.C., Gengenbach, T.R., Johnson, G. and Steele, J.G., 1994. Growth of human cells on plasma polymers: Putative role of amine and amide groups. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. 5(6), 531-554.

## Capítulo 8 -Referências

- [134] Lopez, L. C., Gristina, R., Ceccone, G., Rossi, F., Favia, P. and d'Agostino R., 2005. Immobilization of RGD peptides on stable plasma-deposited acrylic acid coatings for biomedical devices. *Surface and Coatings. Technology.* 200(1-4), 1000-1004.
- [135] Bartolo, L. De, Morelli, S., Lopez, L. C., Giorno, L., Campana, C., Salerno, S., Rende, M., Favia, P., Detomaso, L., Gristina, R., d'Agostino, R. and Drioli, E., 2005. Biotransformation and liver-specific functions of human hepatocytes in culture on RGD-immobilized plasma-processed membranes. *Biomaterials.* 26(21), 4432-4441.
- [136] Sokolsky-Papkov, M., Agashi, K., Olaye, A., Shakesheff, K. and Domb A.J., 2007. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 59(4-5), 187–206.
- [137] Lode, A., Wolf-Brandstetter, C., Reinstorf, A., Bernhardt, A., Konig, U., Pompe, W. and Gelinsky, M., 2007. Calcium phosphate bone cements, functionalized with VEGF: Release kinetics and biological activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 81(2), 474–483.
- [138] Murphy, W.L., Peters, M.C., Kohn, D.H. and Mooney, D.J., 2000. Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 21(24), 2521–2527.
- [139] Kanczler, J.M., Barry, J., Ginty, P., Howdle, S.M., Shakesheff, K.M. and Oreffo, R.O.C., (2007). Supercritical carbon dioxide generated vascular endothelial growth factor encapsulated poly(DL-lactic acid) scaffolds induce angiogenesis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 352(1), 135–141, 2007
- [140] F. Gu, Amsden, B. and Neufeld, R., 2004. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. *Journal of Controlled Release.* 96(3), 463-472.
- [141] Arm, D.M., Tencer, A.F., Bain, S.D. and Celino, D., 1996. Effect of controlled release of platelet-derived growth factor from a porous hydroxyapatite implant on bone ingrowth. *Biomaterials.* 17(7), 703–709.

- [142] Delgado, J.J., Evora, C., Sanchez, E., Baro, M. and Delgado, A., 2006. Validation of a method for non-invasive in vivo measurement of growth factor release from a local delivery system in bone. *Journal of Controlled Release*, 114(2), 223–229.
- [143] Nakahara, T., Nakamura, T., Kobayashi, E., Inoue, M., Shigeno, K., Tabata, Y., Eto, K. and Shimizu, Y., 2003. Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane. *Tissue Engineering*. 9(1), 153–162.
- [144] Wei, G.B., Jin, Q.M., Giannobile, W.V. and Ma, P.X., Nano-fibrous scaffold for controlled delivery of recombinant human PDGF-BB. *Journal of Controlled Release*. 112(1), 103–110.
- [145] Mogi M., Kondo, A., Kinpara, K. and Togari, A., 2000. Antiapoptotic action of nerve growth factor in mouse osteoblastic cell line. *Life Sciences*. 67(10), 1197–1206.
- [146] Letic-Gavrilovic, A., Piattelli, A. and Abe, K., 2003. Nerve growth factor beta(NGF beta) delivery via a collagen/hydroxyapatite (Col/HAp) composite and its effects on new bone ingrowth. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*.14, 95–102.
- [147] Begley, D.J., 2004. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & Therapeutics*. 104(1), 29-45.
- [148] Premaraj, S., Mundy, B., Parker-Barnes, J., Winnard, P.L. and Moursi, A.M., 2005. Collagen gel delivery of Tgfbeta3 non-viral plasmid DNA in rat osteoblast and calvarial culture. *Orthodontics and Craniofacial Research*. 8, 320–322.
- [149] Gombotz, W.R., Pankey, S.C., Bouchard, L.S., Ranchalis, J. and Puolakkainen, P., 1993. Controlled release of TGF-beta 1 from a biodegradable matrix for bone regeneration. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. 5(1-2), 49–63.
- [150] Jaklenec, A., Hinckfuss, A., Bilgen, B., Ciombor, D.M., Aaron, R. and Mathiowitz, E., 2008. Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-b1 from PLGA microsphere-based scaffolds. *Biomaterials*. 29(10), 1518-1525.

- [151] Park, H., Temenoff, J.S., Holland, T.A., Tabata, Y. and Mikos, A.G., 2005. Delivery of TGF b1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications. *Biomaterials*. 26(34), 7095–7103.
- [152] Li, C., Vepari, C., Jin, H.J., Kim, H.J. and Kaplan, D.L., 2006. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 27(16), 3115–3124.
- [153] Yilgor, P., Tuzlakoglu, K., Reis, R.L., Hasirci, N. and Hasirci, V., 2009. Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 30(21), 3551-3559.
- [154] Chen, B., Lin, H., Wang, J., Zhao, Y., Wang, B., Zhao, W., Sun, W. and Dai, J., 2007. Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials*. 28(6), 1027–1035.
- [155] Rai, B., Teoh, S.H., Ho, K.H., Hutmacher, D.W., Cao, T., Chen, F. and Yacob, K., 2004. The effect of rhBMP-2 on canine osteoblasts seeded onto 3D bioactive polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials*. 25(24), 5499–5506.
- [156] Shen, H., Hu, X., Bei, J. and Wang, S., 2008. The immobilization of basic fibroblast growth factor on plasmatreated poly(lactide-co-glycolide). *Biomaterials*. 29(15), 2388-2399.
- [157] Delong, S.A., Moon, J.J. and West, J.L., 2005. Covalently immobilized gradients of bFGF on hydrogel scaffolds for directed cell migration, *Biomaterials*. 26(16), 3227–3234.
- [158] Leong, K.F., Cheah, C.M. and Chua, C.K., 2003. Solid freeform fabrication of the three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, *Biomaterials*. 24(13), 2363–2378.

[159] Bártolo, P.J., Almeida, H.A. and Laoui, T., 2009. Rapid prototyping and manufacturing for tissue engineering scaffolds. *International Journal of Computer Applications in Technology*. 36(1), 1–9.

[160] Nair, L.S. and Laurencin, C.T., 2006. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 102, 47-90.

[161] Velema, J. and Kaplan, D., 2006. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 102, 187-238.

[162] Chan, G. and Mooney, D.J., 2008. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response, *Trends in Biotechnology*. 26(7), 382-392.

[163] De Santis, R., Gloria, A., Russo, T., D'Amora, U., Zeppetelli, S., Tampieri, A., Herrmannsdörfer, T. and Ambrosio, L., 2011. A route toward the development of 3D magnetic scaffolds with tailored mechanical and morphological properties for hard tissue regeneration: Preliminary study. *Virtual and Physical Prototyping*. 6(4), 189-195.

[164] Williams, D.F., Black, J. and Doherty, P.J., 1992. Second consensus conference on definitions in biomaterials, Chester, England. In: Doherty PJ, Williams RF, Williams DF and Lee AJC, eds. *Biomaterial–tissue interfaces*. *Advances in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier.

[165] Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J. and Noël, D., 2009. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in Biotechnology*. 27(5), 307-314.

[166] Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J. and Boccaccini, A.R., 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 27(18), 3413-3431.

[167] Boccaccini, A.R., Blaker, J.J., Maquet, V., Day, R.M. and Jérôme, R., 2005. Preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and

## Capítulo 8 -Referências

PLGA/Bioglass® composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*. 25(1), 23-31.

[168] Habraken, W.J.E.M., Wolke, J.G.C. and Jansen, J.A., 2007. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59(4-5), 234-248.

[169] Shor, L., Guçeri, S., Wen, X., Gandhi, M. and Sun, W., 2007. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials*. 28(35), 5291-5297.

[170] Abbah, S.A., Lam, C.X.L., Hutmacher, D.W., Goh, J.C.H. and Wong, H.K., 2009. Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold used as fusion cage device in a large animal model of spinal reconstructive surgery. *Biomaterials*. 30 (28), 1-8.

[171] Sabir, M.I., Xu, X. and Li, L., 2009. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*. 44(21), 5713–5724.

[172] Woodruff, M.A. and Hutmacher, D.W., 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 35(10), 1217-1256.

[173] Williams, J.M., Adewunmi, A., Schek, R.M., Flanagan, C.L., Krebsbach, P.H., Feinberg, S.E., Hollister, S.J. and Das, S., 2005. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*. 26(23), 4817-4827.

[174] Puppi, D., Detta, N., Piras, A.M., Chiellini, F., Clarke, D.A., Reilly, G.C. and Chiellini, E., 2010. Development of Electrospun Three-arm Star Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Meshes for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Biosciences*. 10(8), 887-897.



## Capítulo 8 -Referências

- [175] Reignier, J. and Huneault, M.A., 2006. Preparation of interconnected poly( $\epsilon$ -caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching. *Polymer*. 47(13), 4703-4717.
- [176] Yu, D., Li, Q., Mu, X., Chang, T. and Xiong, Z., 2008. Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 37(10), 929-934.
- [177] Cao, H. and Kuboyama, N., 2010. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ $\beta$ -TCP for bone tissue engineering. *Bone*. 46(2), 386-395.
- [178] Li, W-J., Cooper Jr, J.A., Mauck, R.L. and Tuan, R.S., 2006. Fabrication and characterization of six electrospun poly( $\alpha$ -hydroxyester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*. 2(4), 377-385.
- [179] Melchels, F.P.W., Feijen, J. and Grijpma, D.W., 2009. A poly(D,L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomaterials*. 30(23-24), 3801-3809.
- [180] Xiong, Z., Yan, Y., Zhang, R. and Sun, L., 2001. Fabrication of porous poly(L-lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering via precise extrusion. *Scripta Biomaterialia*. 45(7), 773-779.
- [181] Lu, L., Peter, S.J., Lyman, M.D., Lai, H-L., Leite, S.M., Tamada, J.A., Vacanti, J.P., Langer, R. and Mikos, A.G., 2000. In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams. *Biomaterials*. 21(15), 1595-1605.
- [182] Cooke, M.N., Fisher, J.P., Dean, D., Rimnac, C. and Mikos A.G., 2003. Use of Stereolithography to Manufacture Critical-Sized 3D Biodegradable Scaffolds for Bone Ingrowth". *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 64 (2), 65-69.

## Capítulo 8 -Referências

- [183] Sombatmankhong, K., Sanchavanakit, N., Pavasant, P. and Supaphol, P., 2007. Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend. *Polymer*. 48(5), 1419-1427.
- [184] Doyle, C., Tanner, E.T. and Bonfield, W., 1991. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxiapatite. *Biomaterials*. 12(9), 841-847.
- [185] Freier, T., Kunze, C., Nischan, C., Kramer, S., Sternberg, K., SaB, M., Hopt, U.T. and Schmitz, K.P., 2002. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patchbased on poly(3-hydroxybutyrate). *Biomaterials*. 23(13), 2649-2657.
- [186] Köse, G.T., Kenar, H., Hasirci, N. and Hasirci, V., 2003. Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 24(11), 1949-1958.
- [187] Engelberg, I. and Kohn, J., 1991. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. *Biomaterials*. 12(3), 292-304.
- [188] Ibim, S.M., Uhrich, K.E., Bronson, R., El-Amin, S.F., Langer, R.S. and Laurencin, C.T., 1998. Poly(anhydride-co-imides): in vivo biocompatibility in a rat model. *Biomaterials*. 19(10), 941-951.
- [189] Ibim, S.M., Uhrich, K.E., Attawia, M., Shastri, V.R., El-Amin, S.F., Bronson, R., Langer, R. and Laurencin, C.T., 1998. Preliminary in vivo report on the osteocompatibility of poly(anhydride-co-imides) evaluated in a tibial model. *Journal of Biomedical Materials Research*. 43(4), 374-379.
- [190] Khan, Y., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G. and Laurencin, C.T., 2008. Tissue Engineering of Bone: Material and Matrix Considerations. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 90(1), 36-42.

## Capítulo 8 -Referências

- [191] Nukavarapu, S.P., Kumbar, S.G., Brown, J.L., Krogman, N.R., Weikel, A.L., Hindenlang, M.D., Nair, L.S., Allcock, H.R. and Laurencin, C.T., 2008. Polyphosphazene/Nano-Hydroxyapatite Composite Microsphere Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules*. 9(7), 1818–1825.
- [192] Singh, A., Krogman, N.R., Sethuraman, S., Nair, L.S., Sturgeon, J.L., Brown, P.W., Laurencin, C.T. and Allcock, H.R., 2006. Effect of Side Group Chemistry on the Properties of Biodegradable L-Alanine Cosubstituted Polyphosphazenes. *Biomacromolecules*. 7(3), 914-918.
- [193] Bhattacharyya, S., Nair, L.S., Sing, A., Krogman, N.R., Bender, J., Greish, Y.E., Brown, P.W., Allcock, H.R. and Laurencin, C.T., 2005. Development of Biodegradable Polyphosphazene- Nanohydroxyapatite Composite Nanofibers Via Electrospinning”. *Materials Research Society Symposium Proceedings*. 845, AA4.2.
- [194] Riboldi, S.A., Sampaolesi, M., Neuenschwander, P., Cossu, G. and Mantero, S., 2005. Electrospun degradable polyesterurethane membranes: potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials*. 26(22), 4606-4615.
- [195] Laschke, M.W., Strohe, A., Menger, M.D., Alini, M. and Eglin, D., 2010. In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*. 6(6), 2020-2027.
- [196] Vozzi, G., Rechichi, A., Dini, F., Salvadori, C., Vozzi, F., Burchielli, S., Carlucci, F., Arispici, M., Ciardelli, G., Giusti, P. and Ahluwalia, A., 2008. PAM-Microfabricated Polyurethane Scaffolds: in vivo and in vitro Preliminary Studies. *Macromolecular Bioscience*. 8(1), 60–68.
- [197] Patterson, J., Siew, R., Herring, S.W., Lin, A.S.P., Guldberg, R. and Stayton, P.S., 2010. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials*. 31(26), 6772-6781.

## Capítulo 8 -Referências

- [198] Manferdini, C., Guarino, V., Zini, N., Raucci, M.G., Ferrari, A., Grassi, F., Gabusi, E., Squarzoni, S., Facchini, A., Ambrosio, L. and Lisignoli, G., 2010. Mineralization behavior with mesenchymal stromal cells in a biomimetic hyaluronic acid-based scaffold. *Biomaterials*. 31(14), 3986-3996
- [199] Liu, Y., Ma, G., Fang, D., Xu, J., Zhang, H. and Nie, J., 2011. Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers*. 83(2), 1011-1015.
- [200] Burdick, J.A., Chung, C., Jia, X., Randolph, M.A. and Langer, R., 2005. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules*. 6(1), 386-391.
- [201] Shih, Y.-R. V., Chen, C.-N., Tsai, S.-W., Wang, Y.J. and Lee, O.K., 2006. Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. *Stem Cells*. 24(11), 2391–2397.
- [202] Wahl, D.A., Sachlos, E., Liu, C. and Czernuszka, J.T., 2007. Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 18(2), 201–209.
- [203] Walton, R.S., Brand, D.D. and Czernuszka, J.T., 2010. Influence of telopeptides, fibrils and crosslinking on physicochemical properties of Type I collagen films. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 21(2), 451–461.
- [204] Meyers, M.A., Chen, P.-Y., Lin, A.Y.-M. and Seki, Y., 2008. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*. 53(1), 1-206.
- [205] Linnes, M.P., Ratner, B.D. and Giachelli, C.M., 2007. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*. 28(35), 5298–5306.
- [206] Guthold, M., Liu, W., Sparks, E.A., Jawerth, L.M., Peng, L., Falvo, M., Superfine, R., Hantgan, R.R. and Lord, S.T., 2007. A Comparison of the Mechanical and Structural

Properties of Fibrin Fibers with Other Protein Fibers. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 49(3), 165–181.

[207] Bigi, A., Panzavolta, S. and Rubini, K., 2004. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*. 25(25), 5675–5680.

[208] Wua, X., Liu, Y., Li, X., Wen, P., Zhang, Y., Long, Y., Wang, X., Guo, Y., Xing, F. and Gao, J., 2010. Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomaterialia*. 6(3), 1167-1177.

[209] Zhang, Y., Ouyang, H., Lim, C. T., Ramakrishna, S. and Huang, Z.-M., 2005. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 72(1), 156–165.

[210] Takahashi, Y., Yamamoto, M. and Tabata, Y., 2005. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 26(23), 4856-4865.

[211] Liu, L., Xiong, Z., Yan, Y., Zhang, R., Wang, X. and Jin, L., 2009. Multinozzle low-temperature deposition system for construction of gradient tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 88(1), 254–263.

[212] Kim, H.W., Kim, H.E. and Knowles, J.C., 2006. Production and potential of bioactive glass nanofibers as a next-generation biomaterial. *Advanced Functional Materials*. 16(12), 1529–1535.

[213] Kim, H.W., Kim, H.E. and Knowles, J.C., 2008. Nanofibrous glass tailored with apatite fibronectin interface for bone cell stimulation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 8(6), 3013–3019.

[214] Huang, J. and Best, S.M., 2007. Ceramic biomaterials. In: Boccaccini AR and Gough JE, eds. *Tissue engineering using ceramics and polymers*. Woodhead Publishing. 3-31.

## Capítulo 8 -Referências

- [215] Bretcanu, O., Samaille, C. and Boccaccini, A.R., 2008. Simple methods to fabricate Bioglass<sup>®</sup>-derived glass–ceramic scaffolds exhibiting porosity gradient”. *Journal of Materials Science*. 43(12), 4127-4134.
- [216] Wu, Y., Hench, L.L., Du, J., Choy, K.L. and Guo, J., 2004. Preparation of hydroxyapatite fibers by electrospinning technique. *Journal of the American Ceramic Society*. 87(10), 1988–1991.
- [217] Levy, R.A., Chu, T.G., Holloran, J.W., Feinberg, S.E. and Hollister, S., 1997. CT-generated porous hydroxyapatite orbital floor prosthesis as a prototype bioimplant. *American Journal of Neuroradiology*. 18(8), 1522–1525.
- [218] Lee, G. and Barlow, J.W. 1996. Selective laser sintering of bioceramic materials for implants. *Proceedings of the 96 SFF Symposium, Austin*, 376-380.
- [219] Leukers, B., Gülkan, H., Irsen, S.H., Milz, S., Tille, C., Schieker, M. and Seitz, H. 2005. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 16(12), 1121-1124.
- [220] Porter, A.E., Patel, N. and Best, S., 2008. Hydroxyapatite. In: Wnek GE and Bowlin GL, eds. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. New York: Informa Healthcare. 1451-1463.
- [221] Singer, N.G. and Caplan, A.I., 2010. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 6, 457–78.
- [222] Korossis, S.A., Bolland, F., Kearney, J.N., Fisher, J. and Ingham, E., 2005. Bioreactors in tissue engineering. In: Ashammakhi N and Reis RL, eds. *Topics in tissue engineering*. EXPERTISSUES, E-Book. Chapter 8, 1-23.
- [223] Gomes, M.E. and Reis, R.L., 2004. Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. Part 2 Systems for temporary replacement and advanced tissue regeneration. *International Materials Reviews*. 49(5), 274–285.

## Capítulo 8 -Referências

- [224] Ho, M.H., Kuo, P.Y., Hsieh, H.J., Hsien, T.Y., Hou, L.T., Lai, J.Y. and Wang, D.W., 2004. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods, *Biomaterials*, 25(1), 129–138.
- [225] Whang, K., Thomas, C.H., Healy, K.E. and Nuber, G., 1995. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer*. 36(4), 837–842.
- [226] Melchels, F.P.W., Domingos, M.A.N., Klein, T.J., Malda, J., Bartolo, P.J. and Hutmacher, D.W., 2012. Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science*. (DOI:[10.1016/j.progpolymsci.2011.11.007](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.11.007)).
- [227] Bártolo, P.J., 2001. Optical approaches to macroscopic and microscopic engineering. PhD Thesis, University of Reading, UK.
- [228] Bártolo, P.J., Mendes, A. and Jardini, A., 2004. Bio-prototyping. In: Brebbia CA. Sucharov L and Pascolo P, eds. *Design and Nature II – comparing design in nature with science and engineering*. Southampton: WIT Press. 10 pages.
- [229] Ritman, E.L., 2004. Micro-computed tomography – Current status and developments, *Annual Review of Biomedical Engineering*. 6, 185-208.
- [230] Potter, H.G., Nestor, B.J., Sofka, C.M., Ho, S.T., Peters, L.E. and Salvati, E.A., 2004. Magnetic resonance imaging after total hip arthroplasty: evaluation of periprosthetic soft tissue. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 86(9), 1947-1954.
- [231] Fenster, A. and Downey, D.B., 2002. 3-D ultrasound imaging: a review. *Engineering in Medicine and Biology Magazine*. 15(6), 41-51.
- [232] McElroy, D.P., MacDonald, L.R., Beekman, F.J., Yuchuan, W., Patt, B.E., Iwanczyk, J.S., Tsui, B.M.W. and Hoffman, E.J., 2002. Performance evaluation of A-SPECT: a high resolution desktop pinhole SPECT system for imaging small animals. *Nuclear Science*, 49(5), 2139-2147.

## Capítulo 8 -Referências

- [233] Edinger, M., Cao, Y., Hornig, Y.S. , Jenkins, D.E., Verneris, M.R. , Bachmann, M.H., Negrin, R.S. and Contag, C.H., 2002. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *European Journal of Cancer*. 38(16), 2128-2136.
- [234] Norotte, C., Marga, F.S., Niklason, L.E. and Forgacs, G., 2009. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials*. 30(30), 5910-5917.
- [235] Arcaute, K., Mann, B.K. and Wicker, R.B., 2006. Stereolithography of three-dimensional bioactive poly(ethylene glycol) constructs with encapsulated cells. *Annals of Biomedical Engineering*. 34(9), 1429-1441.
- [236] He, J., Li, D., Liu, Y., Gong, H. and Lu, B., 2008. Indirect fabrication of microstructured chitosan-gelatin scaffolds using rapid prototyping, *Virtual and Physical Prototyping*. 3(3), 159-166.
- [237] Pomerantz, I., Gilad, S., Dollberg, Y., Bem-Ezra, B., Sheinman, Y., Barequet, G. and Katz, M., 1996. Three dimensional modeling apparatus. US Patent 5519816.
- [238] Bártolo, P.J., 2011. Stereolithographic processes. In: Bartolo PJ, ed. *Stereolithography, materials, processes and applications*. New York: Springer. 1-36.
- [239] Bártolo, P.J., 2008. Multimaterial microstereo-termo-litografia (microSTLG). Research project financed by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT).
- [240] Bártolo, P.J. and Gaspar, J., 2008. Metal filled resin for stereolithography metal part. *Annals of the CIRP*. 57, 235-238.
- [241] Chan, V., Zorlutuna, P., Jeong, J.H., Kong, H., Bashir, R. 2010. Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation. *Lab Chip*. 10, 2062-2070.
- [242] Liu, V.A. and Bhatia, S.N., 2002. Three-dimensional patterning of hydrogels containing living cells. *Biomedical Microdevices*. 4, 257-266.



## Capítulo 8 -Referências

- [243] Forderhase, P.F., Deckard, C.R. and Klein, J.M., 1993. Apparatus and method for producing parts with multi-directional powder delivery. US Patent 5252264.
- [244] Naing, M.W., Chua, C.K. and Leong, K.F., 2008. Computer aided tissue engineering scaffold fabrication. In: Bidanda B and Bártolo PJ. eds. Virtual Prototyping & Biomanufacturing in Medical Applications. New York: Springer, 67-85.
- [245] Tan, K.H., Chua, C.K., Leong, K.F., Cheah, C.M., Cheang, P., Abu Bakar, M.S. and Cha, S.W., 2003. Scaffold development using selective laser sintering of polyetheretherketone-hydroxyapatite biocomposite blends. *Biomaterials*. 24(18), 3115-3123.
- [246] Zhou, W.Y., Lee, S.H., Wang, M., Cheung, W.L. and Ip, W.Y., 2008. Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(L-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 19(7), 2535-2540.
- [247] Hao, L., Savalani, M.M., Zhang, Y., Tanner, K.E. and Harris, R.A., 2006. Selective laser sintering of hydroxyapatite reinforced polyethylene composites for bioactive implants and tissue scaffold development. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 220(4), 521-531.
- [248] Vandenbroucke, B. and Kruth, J.P., 2008. Direct Digital Manufacturing of Complex Dental Prostheses. In: Bártolo P and Bidanda B, eds. *Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine*. New York: Springer. 109-124.
- [249] Leu, M.C., Delli, P. and Walker, M.P., 2008. Digital Design and Fabrication in Dentistry. P. Bártolo and B. Bidanda, eds. *Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine*. New York, USA: Springer. 125-155.
- [250] Kyogoku, H., Ramos, J.A., Bourell, D.L., 2002, Laser melting of Ti-Ni shape memory alloy. *Proceedings of SFF Symposium*. Austin: 668–675.
- [251] SABREEN, 2012. [www.sabreen.com](http://www.sabreen.com). Acedido em 05/03/2012.

## Capítulo 8 -Referências

- [252] EETimes, 2012. [www.eetimes.com](http://www.eetimes.com). Acedido em 05/03/2012.
- [253] Crump, S.S., 1989. Apparatus method for creating three-dimensional objects. US Patent 5121329.
- [254] Woodfield, T.B.F., Malda, J., de Wijn, J., Peters, F., Riesle, J. and Van Blitterswijk, C.A., 2004. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fibre-deposition technique. *Biomaterials*. 25(18), 4149–4161.
- [255] Wang, F., Shor, L., Darling, A., Khalil, S., Güçeri, S. and Lau, A., 2004. Precision deposition and characterization of cellular poly- $\epsilon$ -caprolactone tissue scaffolds. *Rapid Prototyping Journal*. 10, 42–49.
- [256] Khalil, S., Nam, J. and Sun, W., 2005. Multi-nozzle deposition for construction of 3D biopolymer tissue scaffolds. *Rapid Prototyping Journal*. 11(1), 9-17.
- [257] Xiong, Z., Yan, Y., Zhang, R. and Wang, X., 2005. Organism manufacturing engineering based on rapid prototyping principles. *Rapid Prototyping Journal*. 11, 160-166.
- [258] Yan, Y., Zhang, R. and Lin, F., 2003. Research and applications on bio-manufacturing. Proceedings of the 1st International Conference on Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping, School of Technology and Management, Leiria, Portugal.
- [259] Vozzi, G., Flaim, C., Ahluwalia, A. and Bhatia, S., 2003. Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition. *Biomaterials*. 24(14), 2533-2540.
- [260] Vozzi, G., 2012. Is it Possible to Construct an Optimal Scaffold for Regenerative Medicine Applications? 2<sup>nd</sup> Advanced Course on Regenerative Medicine, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> of February, Leiria, Portugal.

## Capítulo 8 -Referências

- [261] Vozzi, G., Previti, A., De Rossi, D. Ahluwalia, A., 2002. Microsyringe-based deposition of two-dimensional and three-dimensional polymer scaffolds with a well-defined geometry for application to tissue engineering. *Tissue Engineering*. 8(6), 1089-1098.
- [262] Miranda, P., Pajares, A., Saiz, E., Tomsia, A.P. and Guiberteau, F., 2008. Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 85(1), 218-227.
- [263] Cesarano, J. and Calvert, P., 2000. Freeforming objects with low-binder slurry. US Patent 6027326.
- [264] Miranda, P., Saiz, E., Gryn, K. and Tomsia, A.P., 2006. Sintering and robocasting of  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications. *Acta Biomaterialia*. 2-4, 457-466.
- [265] Ang, T.H., Sultana, F.S.A., Hutmacher, D.W., Wong, Y.S., Fuh, J.Y.H., Mo, X.M., Loh, H.T., Burdet, E. and Teoh, S.H., 2002. Fabrication of 3D chitosan–hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system. *Materials Science and Engineering – C*. 20(1-2), 35-42.
- [266] Almeida, H.A., Mota, C., Mateus, A., Bártolo, P.J., Ferreira, N., Domingos, M., Alves, N.M., 2010. Processo e equipamento de fabrico rápido por bioextrusão/Process and equipment for rapid fabrication through bioextrusion. Portuguese Patent nº104247.
- [267] Sachs, E.M., Haggerty, J.S., Cima, M.S. and Williams, P.A., 1989. Three-dimensional printing techniques. US Patent 5204055.
- [268] Kim, S.S., Utsunomiya, H., Koski, J.A., Wu, B.M., Cima, M.J., Sohn, J., Mukai, K., Griffith, L.G. and Vacanti, J.P., 1998. Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffolds with an intrinsic network of channels. *Annals of Surgery*. 228(1), 8–13.

## Capítulo 8 -Referências

- [269] Lam, C.X., Mo, X.M., Teoh, S.H. and Hutmacher, D.W., 2002. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. *Materials Science and Engineering*. 20(1-2), 49–56.
- [270] Sachlos, E., Reis, N., Ainsley, C., Derby, B. and Czernuszka, J.T., 2003. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials*. 24(8), 1487-1497.
- [271] Cui, X. and Boland, T., 2009. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials*. 30(31), 6221-6227.
- [272] Roth, E.A., Xu, T., Das, M., Gregory, C., Hickman, J.J. and Boland, T., 2004. Inkjet printing for high-throughput cell patterning. *Biomaterials*. 25, 3707-3715.
- [273] Tao, X., Jin, J., Gregory, C., Hickman, J.J. and Boland, T., 2005. Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials*. 26, 93-99.
- [274] Boland, T., Tao, X., Damon, B.J., Manley, B., Kesari, P., Jalota, S. and Bhaduri, S., 2006. Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs. *Materials Science and Engineering*. 27, 372–376.
- [275] Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. and Markwald, R.R., 2003. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *TRENDS in Biotechnology*. 21(4), 157-161.
- [276] Yan Y., Zang R., Lin F., 2003. Research and application on bio-manufacturing. In: Bartolo PJ *et al*, eds. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference on Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping*. Leiria: Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Leiria, 23-29.
- [277] Catros, S., Fricain, J-C., Guillotin, B., Pippenger, B., Bareille, R., Remy, M., Lebraud, E., Desbat, B., Amédée, J. Fabien, G., 2011. Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. *Biofabrication*. 3. doi: 10.1088/1758-5082/3/2/025001

## *Capítulo 8 -Referências*

- [278] Martin, I., Wendt D. and Heberer, M., 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*. 22(2), 80-86.
- [279] Kohn, J. and Langer, R., 1996. Bioresorbable and bioerodible materials. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, and Lemons JE, eds. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. New York: Academic Press. 64-72.
- [280] Jagur-Grodzinski, J., 1999. Biomedical application of functional polymers. *Reactive & Functional Polymers*. 39(2), 99-138.
- [281] Laurencin, C.T., Attawia, M.A., Elgendy, H.E. and Herbert, K.M., 1996. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized Matrices. *Bone*. 19(1), 93-99.
- [282] El-Amin, S.F., Attawia, M., Lu, H.H., Shah, A.K., Chang, R., Hickok, N.J., Tuan, R.S. and Laurencin, C.T., 2002. Integrin expression by human osteoblasts cultured on degradable polymeric materials applicable for tissue engineered bone. *Journal of Orthopedic Research*. 20(1), 20-28.
- [283] Borden, M., Attawia, M., Khan, Y., El-Amin, S.F. and Laurencin C.T., 2004. Tissue-engineered bone formation in vivo using a novel sintered polymeric microsphere matrix. *Journal of Bone and Joint Surgery British Volume*. 86(8), 1200-1208.
- [284] Borden, M., Attawia, M. and Laurencin, C.T., 2002. The sintered microsphere matrix for bone tissue engineering: in vitro osteoconductivity studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 61(3), 421-429.
- [285] Laurencin, C.T., Attawia, M.A., Lu, L.Q., Borden, M.D., Lu, H.H., Gorum, W.J. and Lieberman, J.R., 2001. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration. *Biomaterials*. 22(11), 1271-1277.

## Capítulo 8 -Referências

- [286] Laurencin, C.T., Ambrosio, A.M., Borden, M.D. and Cooper, J.A. Jr. 1999. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 1, 19-46.
- [287] Ibim, S.M., Uhrich, K.E., Attawia, M., Shastri, V.R., El-Amin, S.F., Bronson, R., Langer, R. and Laurencin, C.T., 1998. Preliminary in vivo report on the osteocompatibility of poly(anhydride-co-imides) evaluated in a tibial model. *Journal of Biomedical Materials Research*. 43(4), 374–379.
- [288] Singh, A., Krogman, N.R., Sethuraman, S., Nair, L.S., Sturgeon, J.L., Brown, P.W., Laurencin, C.T. and Allcock, H.R., 2006. Effect of Side Group Chemistry on the Properties of Biodegradable L-Alanine Cosubstituted Polyphosphazenes. *Biomacromolecules*. 7(3), 914-918.
- [289] Burkoth, A.K., Burdick, J. and Anseth, K.S., 2000. Surface and bulk modifications to photocrosslinked polyanhydrides to control degradation behavior. *Journal of Biomedical Materials Research*. 51(3), 352-359.
- [290] Uhrich, K.E., Ibim, S.E., Larrier, D.R., Langer, R. and Laurencin, C.T., 1998. Chemical changes during in vivo degradation of poly(anhydride-imide) matrices. *Biomaterials*. 19(22), 2045-2050.
- [291] Lee, K.W., Wang, S., Lu, L., Jabbari, E., Currier, B.L. and Yaszemski, M.J., 2006. Fabrication and characterization of poly(propylene fumarate) scaffolds with controlled pore structures using 3-dimensional printing and injection molding. *Tissue Engineering*. 12(10), 2801-2811.
- [292] Dean, D., Wolfe, M.S., Ahmad, Y., Totonchi, A., Chen, J.E., Fisher, J.P., Cooke, M.N., Rimnac, C.M., Lennon, D.P., Caplan, A.I., Topham, N.S. and Mikos, A.G., 2005. Effect of transforming growth factor beta 2 on marrow-infused foam poly(propylene fumarate) tissue engineered constructs for the repair of critical-size cranial defects in rabbits. *Tissue Engineering*. 11, 923-939.

## Capítulo 8 -Referências

- [293] Fisher, J.P., Vehof, J.W., Dean, D., van der Warden, J.P., Holland, T.A., Mikos, A.G. and Jansen, J.A., 2002. Soft and hard tissue response to photocrosslinked poly(propylene fumarate) scaffolds in a rabbit model. *Journal of Biomedical Materials Research*. 59(3), 547-556.
- [294] Shin, H., Quinten Ruhe, P., Mikos, A.G. and Jansen, J.A., 2003. In vivo bone and soft tissue response to injectable, biodegradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels. *Biomaterials*. 24(19), 3201-3211.
- [295] Krogman, N.R., Singh, A., Nair, L.S., Laurencin, C.T. and Allcock, H.R., 2007. Miscibility of bioerodible polyphosphazene/poly(lactide-co-glycolide) blends. *Biomacromolecules*. 8(4), 1306-1312.
- [296] Sethuraman, S., Nair, L.S., El-Amin, S., Farrar, R., Nguyen, M.T., Singh, A., Allcock, H.R., Greish, Y.E., Brown, P.W. and Laurencin, C.T., 2006. In vivo biodegradability and biocompatibility evaluation of novel alanine ester based polyphosphazenes in a rat model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 77(4), 679-687.
- [297] Nair, L.S., Lee, D.A., Bender, J.D., Barrett, E.W., Greish, Y.E., Brown, P.W., Allcock, H.R. and Laurencin, C.T., 2006. Synthesis, characterization, and osteocompatibility evaluation of novel alanine-based polyphosphazenes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 76(1), 206-213.
- [298] Nair, L.S., Bhattacharyya, S., Bender, J.D., Greish, Y.E., Brown, P.W., Allcock, H.R. and Laurencin, C.T., 2004. Fabrication and optimization of methylphenoxy substituted polyphosphazene nanofibers for biomedical applications. *Biomacromolecules*. 5(6), 2212-2220.
- [299] Brode, G.L. and Koleske, J.V., 1973. Lactone polymerization and polymer properties". In: Vogl O and Furukawa J, eds. *Polymerization of Heterocycles*. New York: Marcell Dekker. 97-116.
- [300] Nair, L.S. and Laurencin, C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 32(8-9), 762-98.

## *Capítulo 8 -Referências*

- [301] Suggs, L.J. and Mikos, A.G., 1996. Synthetic biodegradable polymers for medical applications. In: Mark JE, ed. *Physical Properties of Polymers Handbook*. Woodbury: American Institute of Physics. 615-624.
- [302] Storey, R.F. and Taylor, A.E., 1998. Effect of stannous octoate on the composition, molecular weight, and molecular weight distribution of ethyleneglycol-initiated poly(ε-caprolactone). *Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry*. A35, 723-750.
- [303] Okada, M., 2002. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. 27(1), 87–133.
- [304] Coulembier, O., Degee, P., Hedrick, J.L. and Dubois, P., 2006. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: especially poly(β-malic acid) derivatives. *Progress in Polymer Science*. 31, 723–747
- [305] Middleton, J.C. and Tipton, A.J., 2000. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 21(23), 2335–2346.
- [306] Pitt, C.G., 1990. Poly(ε-caprolactone) and its copolymers. In: Chasin M and Langer R, eds. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. New York: Marcel Dekker. 71-120.
- [307] Woodruff, M.A. and Hutmacher, D.W., 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 35(10), 1217-1256.
- [308] Domingos, M., Chiellini, F., Cometa, S., Giglio, E.D., Grillo-Fernandes, E., Bartolo, P.J. and Chiellini, E., 2010. Evaluation of in vitro degradation of PCL scaffolds fabricated via BioExtrusion. Part 1: Influence of the degradation environment. *Virtual and Physical Prototyping*. 5(2), 1-9.
- [309] Dunn, A.S., Campbell, P.G. and Marra, K.G., 2001. The influence of polymer blend composition on the degradation of polymer/hydroxyapatite biomaterials. *Journal of Material Science Materials in Medicine*. 12(8), 673-677.



## Capítulo 8 -Referências

- [310] Lam, C.X.F., Hutmacher, D.W., Schantz, J-T, Woodruff, M.A. and Teoh, S.H., 2008. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 90(3), 906–19.
- [311] Pitt, G.G., Gratzl, M.M., Kimmel, G.L., Surles, J. and Schindler, A., 1981. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly ( $\epsilon$ -caprolactone), and their copolymers *in vivo*. *Biomaterials*. 2(4), 215-220.
- [312] Sun, H., Mei, L., Song, C., Cui, X. and Wang, P., 2006. The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials*. 27(9), 1735–1740.
- [313] Woodward, S.C., Brewer, P.S., Moatamed, F., Schindler, A. and Pitt, C.G. 1985. The intracellular degradation of poly-epsilon-caprolactone. *Journal of Biomedical Materials Research*. 19(4), 437–44.
- [314] Freiberg, S. and Zhu, X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1-2), 1–18.
- [315] Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R. Trehan, A., 2004. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*. 278(1), 1–23.
- [316] Rai, B., Teoh, S.H., Ho, K.H., Hutmacher, D.W., Cao, T., Chen, F. and Yacob, K., 2004. The effect of rhBMP-2 on canine osteoblasts seeded onto 3D bioactive polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials*. 25(24), 5499–5506.
- [317] Shor, L., Guçeri, S., Wen, X., Gandhi, M. and Sun, W., 2007. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions *in vitro*. *Biomaterials*. 28(35), 5291-5297.
- [318] Abbah, S.A., Lam, C.X.L., Hutmacher, D.W., Goh, J.C.H. and Wong, H.K., 2009. Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold used as fusion cage device in a large animal model of spinal reconstructive surgery. *Biomaterials*. 30 (28), 1-8.

## Capítulo 8 -Referências

- [319] Huang, J. and Best, S.M., 2007. Ceramic biomaterials. In: Boccaccini AR and Gough JE, eds. Tissue engineering using ceramics and polymers. Woodhead Publishing. 3-31.
- [320] Knowles, J.C., 2003. Phosphate based glasses for biomedical applications. Journal of Materials Chemistry. 13, 2395-2401.
- [321] Lichte, P., Pape, H.C., Pufe, T., Kobbe, P., Fischer, H., 2011. Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. Injury. 42(6), 569-573.
- [322] Hench, L.L., 1991. Bioceramics: from concept to clinic. Journal of the American Ceramic Society. 74(7), 1487–1510.
- [323] Kalita, S.J., Bhardwaj, A., Bhatt, H.A., 2006. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. Materials Science and Engineering C. 27(3), 441-449.
- [324] Material solutions, 2012. <http://www.materialsolutions.info/thermal.html>. Acedido em 17/02/2012.
- [325] Hohne, G., Hemminger, W.F. and Flammersheim, H.J., 2003. Differential Scanning Calorimetry 2nd edition, New York: Springer.
- [326] Gideon Analytical Labs, 2012. <http://gideonlabs.com/thermal.htm>. Acedido em 17/02/2012.
- [327] Intertek, 2012. <http://www.intertek.com/analysis/thermogravimetric/>. Acedido em 17/02/2012.
- [328] EAG, 2012. [www.eaglabs.com](http://www.eaglabs.com). Acedido em 17/02/2012.
- [329] Mori, S. and Barth, H.G., 1999. Size exclusion chromatography. New York: Springer.

## Capítulo 8 -Referências

- [330] Lucas, E.F., Soares, B.G. and Monteiro, E., 2001. Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica, Rio de Janeiro: E-Papers.
- [331] b-cube, 2012. <http://www.b-cube.ch/>. Acedido em 17/02/2012.
- [332] Archer, R. and Williams, D.J., 2005. Why tissue engineering needs process engineering. *Nature Biotechnology*. 23, 1353-1355.
- [333] Lichte, P., Pape, H.C., Pufe, T., Kobbe, P., Fischer, H., 2011. Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury*. 42(6), 569-573.
- [334] Risbud, M., 2001. Tissue engineering: Implications in the treatment of organ and tissue defects. *Biogerontology*. 2(2), 117–125.
- [335] Tan, K.H., Chua, C.K., Leong, K.F., Cheah, C.M., Gui, W.S., Tan, W.S. and Wiria, F.E., 2005. Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 15(1-2), 113–124.
- [336] Vacanti, C.A., 2006. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Engineering*. 12(5), 1137–1142.
- [337] Jones, J.R., 2009. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. *Journal of the European Ceramic Society*. 29(7), 1275–1281.
- [338] Hollister, S.J., 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*. 4, 518-524.
- [339] Mikos, A.G. and Temenoff, J.S., 2000. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(2), 114–119.
- [340] Ma, P.X., 2004. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*. 7(5), 30–40.
- [341] Yeong, W.Y., Sudarmadji, N., Yu, H.Y., Chua, C.K., Leong, K.F., Venkatraman, S.S., Boey, Y.C.F. and Tan, L.P., 2010. Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering. *Acta Biomaterialia*. 6(6), 2028-2034

## Capítulo 8 -Referências

- [342] Lee, Hyeongjin. and Kim, GeunHyung., 2011. Three-dimensional plotted PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds coated with a collagen layer: preparation, physical properties and *in vitro* evaluation for bone tissue regeneration, *Journal of Materials Chemistry*. 21(17), 6305-6312.
- [343] Seyednejad, H., Gawlitta, D., Dhert, W.J.A, van Nostrum, C.F., Vermonden, T. and Hennink, W.E., 2006. Preparation and characterization of a three-dimensional printed scaffold based on a functionalized polyester for bone tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*. 7(5), 1999-2006.
- [344] Ballyns, J.J. and Bonassar, L.J., 2009. Image-guided tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13(8), 1428-1436.
- [345] Singh, P. and Williams, D.J., 2008. Cell therapies: realizing the potential of this new dimension to medical therapeutics. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2(6), 307-319.
- [346] Patricio, T., Domingos, M., Gloria, A., Coelho, J.F.J., Mitchell, G. and Bartolo, P., 2012. Characterisation of PCL and PCL/PLA 3D scaffolds produced by a new biomanufacturing process. *Rapid Prototyping Journal*. (Submetido).
- [347] Almeida, H.A., Bartolo, P.J. and Ferreira, J.C., 2008. Mechanical behavior and vascularisation analysis of tissue engineering scaffolds. In: Bártolo PJ, ed. *Virtual and rapid manufacturing - Advanced research in virtual and rapid prototyping*. London: Taylor and Francis Group. 71-80.
- [348] Almeida, Henrique., 2006. Design e optimização de scaffolds por mecânica computacional para a engenharia de tecidos. Instituto Superior Técnico: Lisboa. Tese de Mestrado.
- [349] Domingos, M., Chiellini, F., Gloria, A., Ambrosio, L., Bartolo, P.J. and Chiellini, E., 2009. BioExtruder: Study of the influence of process parameters on PCL scaffolds properties. In: Bártolo PJ, ed. *Innovative developments in design and manufacturing -*

## Capítulo 8 -Referências

Advanced research in virtual and rapid prototyping. Boca Raton: Taylor & Francis. 67-73.

[350] Van Tienen, T.G., Heijkants, R.G.J.C., Buma, P., De Groot, J.H., Pennings, A.J. and Veth, R.P.H., 2002. Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes. *Biomaterials*. 23(8), 1731–1738.

[351] Wake, M.C., Patrick, C.W. and Mikos, A.G., 1994. Pore morphology effects on the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates. *Cell Transplant*. 3, 339–343.

[352] Whang, K., Healy, K.E., Elenz, D.R., Nam, E.K., Tsai, D.C., Thomas, C.H., Nuber, G.W., Glorieux, F.H., Travers, R. and Sprague, S.M., 1999. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Engineering*. 5(1), 35–51.

[353] Karageorgiou, V. and Kaplan, D., 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 26(27), 5474–5491.

[354] Russo, T., Gloria, A., D'Antò, V., D'Amora, U., Ametrano, G., Bollino, F., De Santis, R., Ausanio, G., Catauro, M., Rengo, S. and Ambrosio, L., 2010. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) reinforced with sol-gel synthesized organic-inorganic hybrid fillers as composite substrates for tissue engineering. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*. 8(3), 146-152

[355] Zhang, F., Shi, Geng-Sheng., Ren, Ling-Fei., Hu, Fei-Qing., Li, Sheng-Lai. and Xie. Zhi-Jian., 2009. Designer self-assembling peptide scaffold stimulates pre-osteoblast attachment, spreading and proliferation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 20(7), 1475–1481.

[356] Lawrence, B.J. and Madhally, S.V., 2008. Cell colonization in 3D degradable porous matrices. *Cell Adhesion & Migration*. 2(1), 9-16.

## Capítulo 8 -Referências

- [357] Griffon, D.J., Sedighi, M.R., Schaeffer, D.V., Eurell, J.A. and Johnson, A.L., 2006. Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomaterialia*, 2(3), 313-320.
- [358] Lien, Sio-Mei., Ko, Liang-Yu., and Huang, Ta-Jen., 2009. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatine scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 5(2), 670-679.
- [359] Mandal, B.B. and Kundu, S.C., 2009. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*. 30(15), 2956-2965.
- [360] Mygind, T., Stiehler, M., Baatrup, A., Li, H., Zou, X., Flyvbjerg, A., Kassem, M. and Bunker, C., 2007. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 28(6), 1036-1047.
- [361] Gibson, L.J. and Ashby, M.F., 1997. *Cellular Solids: structure and properties*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- [362] Kyriakidou, K., Lucarini, G., Zizzi, A., Salvolini, E., Belmonte, M.M., Mollica, F., Gloria, A. and Ambrosio L., 2008. Dynamic Co-Seeding of Osteoblast and Endothelial Cells on 3D Polycaprolactone Scaffolds for Enhanced Bone Tissue Engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 23(3), 227–243.
- [363] Hutmacher, D.W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K.W., Teoh, S.H. and Tan, K.C., 2001. Mechanical properties and cell culture response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modelling. *Journal of Biomedical Materials Research*. 55(2), 203-216.
- [364] Hutmacher, D.W., Hoque, M.E. and Wong, Y.S., 2008. Design, fabrication and physical characterization of scaffolds made from biodegradable synthetic polymers in combination with RP systems based on melt extrusion. In: Bidanda B and Bártolo PJ, eds. *Virtual Prototyping & Bio-Manufacturing in Medical Applications*. New York: Springer, 261-291.

## Capítulo 8 -Referências

- [365] Hoque, E., San, W.Y., Wei, F., Li, S., Huang, Ming-His., Vert, M. and Hutmacher, D.W., 2009. Processing of polycaprolactone and polycaprolactone-based copolymers into 3D scaffolds, and their cellular responses. *Tissue Engineering Part A*. 15(10), 3013-3024.
- [366] Anderson, E.J., and Tate, M.L.K., 2007. Design of Tissue Engineering Scaffolds as Delivery Devices for Mechanical and Mechanically Modulated Signals. *Tissue Engineering*. 13(10), 2525-2538.
- [367] Salgado, C.L., Sanchez, E.M.S., Zavaglia, C.A.C., Almeida, A.B. and Granja, P.L., 2011. Injectable Biodegradable Polycaprolactone–Sebacic Acid Gels for Bone Tissue Engineering, *Tissue Engineering Part A*. 18 (1-2), 137-146.
- [368] Barbanti, S.H., Santos, A.R., Zavaglia C.A.C. and Duek, E.A.R., 2011. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(d,l-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds used in bone tissue engineering prepared by melt compression–particulate leaching method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 22(10), 2377-2385.
- [369] Zhang, Q., Mochalin, V.N., Neitzel, I., Knoke, I.Y., Han, J., Klug, C.A., Zhou, J.G., Lelkes, P.I. and Gogotsi, Y., 2011. Fluorescent PLLA-nanodiamond composites for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 32(1), 87-94.
- [370] Arafat, M.T., Lam, C.X.F., Ekaputra, A.K., Wong, S.Y., He, C., Hutmacher, D.W., Li, X. and Gibson, I., 2011. High performance additive manufactured scaffolds for bone tissue engineering application. *Soft Matter*. 7, 8013-8022.
- [371] Lin, F., Yan, C., Zheng, W., Fan, W. Adam, C. and Oloyede, A., 2011. Preparation of Mesoporous Bioglass Coated Zirconia Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Advanced Materials Research*. 365, 209-215.
- [372] Rath, S.N., Arkudas, A., Lam, C.X.F., Olkowski, R., Polykandrotis, E., Chróścicka, A., Beier, J.P., Horch, R.E., Hutmacher, D.W. and Kneser, U., 2011. Development of a pre-vascularized 3D scaffold-hydrogel composite graft using an arterio-venous loop for

## Capítulo 8 -Referências

tissue engineering applications. Journal of Biomaterials Applications. doi: 10.1177/0885328211402243

[373] Kolambkar, Y.M., Dupont, K.M., Boerckel, J.D., Huebsch, N., Mooney, D.J., Hutmacher, D.W. and Guldberg, R.E., 2011. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials*. 32(1), 65-74.

[374] Williams, J.M., Adewunmi, A., Schek, R.M., Flanagan, C.L., Krebsbach, P.H., Feinberg, S.E., Hollister, S.J. and Das, S., 2005. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*. 26(23), 4817-4827.

[375] Cao, H. and Kuboyama, N., 2010. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ $\beta$ -TCP for bone tissue engineering. *Bone*. 46(2), 386-395.

[376] Xiong, Z., Yan, Y., Zhang, R. and Sun, L., 2001. Fabrication of porous poly(L-lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering via precise extrusion. *Scripta Biomaterialia*. 45(7), 773-779.

[377] Woodruff, M.A. and Hutmacher, D.W., 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 35(10), 1217-1256.

[378] Rich, J., Jaakkola, T. and Tirri T., 2002. In vitro evaluation of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials*. 23(10), 2143–2150.

[379] Kim, H.W. and Jonathan, C., 2004. Hydroxyapatite/PCL composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*. 25(7-8), 1279–1287.

[380] Bidic SM, Calvert JW, Marra K, Kumta P, Campbell P, Mitchell R, Wigginton, W., Hollinger, J.O., Weiss, L. and Mooney, M.P., 2003. Rabbit Calvarial Wound Healing by Means of Seeded Caprotite<sup>®</sup> Scaffolds. *Journal of Dental Research*. 82(2), 131-135.



## Capítulo 8 -Referências

- [381] Fini, M., Giavaresi, G., Aldini, N.N., Torricelli, P., Botter, R., Beruto, D. and Giardino, R., 2002. A bone substitute composed of polymethylmethacrylate and  $\alpha$ -tricalcium phosphate: results in terms of osteoblast function and bone tissue formation. *Biomaterials*. 23(23), 4523-4531.
- [382] Peter, S.J., Lu, L., Kim, D.J. and Mikos, A.G., 2000. Marrow stromal osteoblast function on a poly(propylene fumarate)/ $\beta$ -tricalcium phosphate biodegradable orthopaedic composite. *Biomaterials*. 21(12), 1207-1213
- [383] Hench, L.L. and Polak, J.M., 2002. Third-generation biomedical materials. *Science*. 295(5557), 1014-1017.
- [384] Murphy, W.L., Simmons, C.A., Kaigler, D. and Mooney, D.J., 2004. Bone Regeneration *via* a Mineral Substrate and Induced Angiogenesis. *Journal of Dental Research*. 83(3), 204-210
- [385] Zhou, Y., Hutmacher, D.W., Varawan, Sae-Lim. and Lim, T.M., 2007. *In vitro* bone engineering based on polycaprolactone and polycaprolactone–tricalcium phosphate composites. *Polymer International*. 56(3), 333-342.
- [386] Schantz, J-T., Brandwood, A., Hutmacher, D.W., Khor, H.L. and Bittner, K., 2005. Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymer-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 16(9), 807-819.
- [387] Hong, Z., Reis, R.L. and Mano, J.F., 2008. Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly(L-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles. *Acta Biomaterialia*. 4(5), 1297-1306.
- [388] Douglas, T., Pamula, E., Hauk, D., Wiltfang, J., Sivananthan, S., Sherry, E. and Warnke, P.H., 2009. Porous polymer/hydroxyapatite scaffolds: characterization and biocompatibility investigations. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 20(9), 1909-1915.

## Capítulo 8 -Referências

- [389] Roeder, R.K., Converse, G.L., Kane, R.J. and Yue, W., 2008. Hydroxyapatite-reinforced polymer biocomposites for synthetic bone substitutes. *JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society*. 60(3), 38-45.
- [390] Shor, L., Guçeri, S., Wen, X., Gandhi, M. and Sun, W., 2007. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials*. 28(35), 5291-5297.
- [391] Mondrinos, M.J., Dembzyński, R., Lu, L., Byrapogu, V.K.C., Wootton, D.M., Lelkes, P.I. and Zhou J., 2006. Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone–calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 27(25), 4399-4408.
- [392] Heo, Su-Jin., Kim, Seung-Eon., Wei, Jie., Kim, Dong-Hwa., Hyun, Yong-Taek., Yun, Hui-Suk., Kim, H.K., Yoon, T.R., Kim, Su-Hyang., Park, Su-A., Shin, J.W. and Shin, Jung-Woog., 2009. In vitro and animal study of novel nano-hydroxyapatite/poly( $\epsilon$ -caprolactone) composite scaffolds fabricated by layer manufacturing process. *Tissue Engineering*. 15(5), 977-989.
- [393] Heo, Su-Jin., Kim, Seung-Eon., Wei, Jie., Hyun, Yong-Taek., Yun, Hui-Suk., Kim, Dong-Hwa., Shin, J.W. and Shin, Jung-Woog., 2007. Fabrication and characterization of novel nano- and micro-HA/PCL composite scaffolds using a modified rapid prototyping process. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 89(1), 108-116.
- [394] Lucchinetti, E., 2001. Dense Bone Tissue as a Molecular Composite. In: Cowin S.C. ed. *Bone Mechanics Handbook*, 2nd edition. Boca Raton, Florida: CRC Press. Chapter 13.

# **Anexos**

---

## **A.1 Componentes do sistema BioCell Printing**

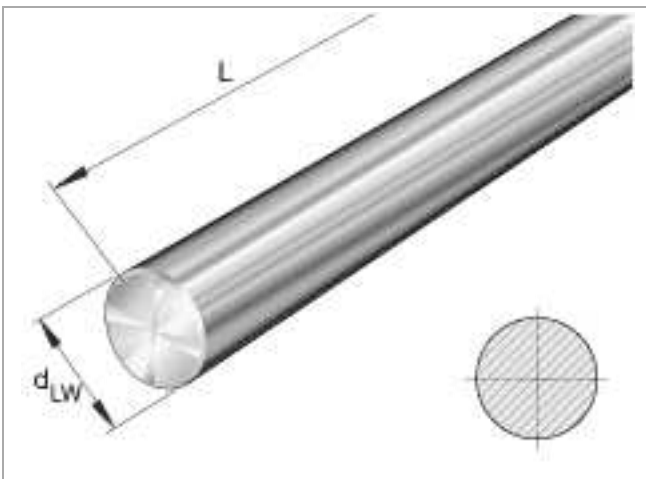
## **A.2 Protocolos Alkaline Phosphatase Assay e Quant-iT™ PicoGreen**



# Shafts W

shafts; corrosion-resistant design possible

The datasheet is only an overview of dimensions and basic load ratings for the selected series. Please ensure that you note all the guidance in these overview pages. Further information is given on many products under the menu item "Description". You can also obtain comprehensive information material via Catalogue selection ([www.ina.de/media-service](http://www.ina.de/media-service)), by e-mail ([kataloge@de.ina.com](mailto:kataloge@de.ina.com)) or telephone +49 (91 32) 82 - 28 97.



	d	L <sub>max</sub>
W 5	5 mm	3600 mm
W 6	6 mm	4000 mm
W 8	8 mm	4000 mm
W 10	10 mm	4000 mm
W 12	12 mm	6000 mm
W 14	14 mm	6000 mm
W 15	15 mm	6000 mm
W 16	16 mm	6000 mm
W 18	18 mm	6000 mm
W 20	20 mm	6000 mm
W 24	24 mm	6000 mm
W 25	25 mm	6000 mm
W 30	30 mm	6000 mm
W 32	32 mm	6000 mm
W 40	40 mm	6000 mm
W 50	50 mm	6000 mm
W 60	60 mm	6000 mm
W 80	80 mm	6000 mm
	d	L <sub>max</sub>

# Fusos de Esferas Laminados

## 1- Características

### A) Intercambiabilidade:

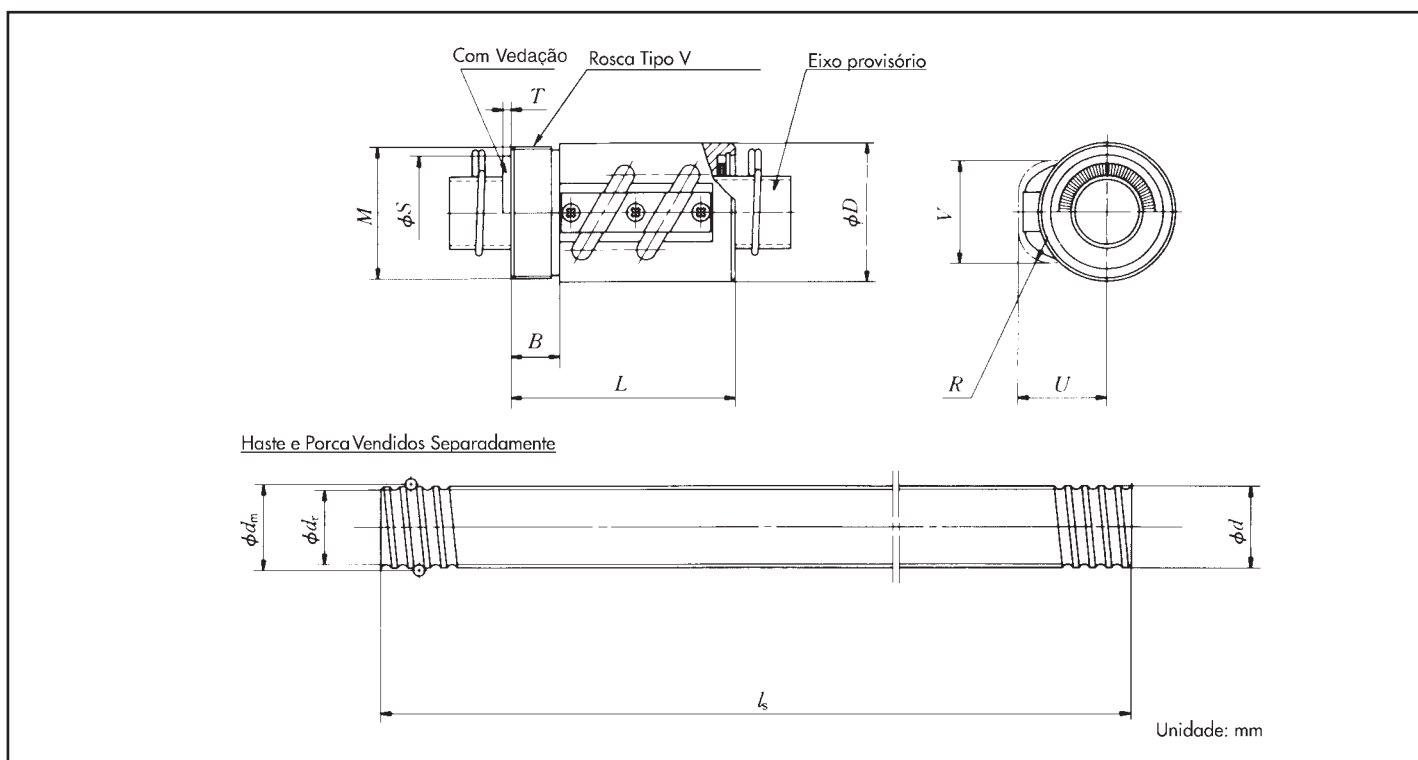
A haste do fuso de esferas e sua porca são Intercambiáveis. Verifique a tabela abaixo para obter as dimensões disponíveis e suas características.

### B) Vedação Padrão (para fusos laminados):

Todos os produtos desta série utilizam-se do sistema padrão de vedação (um exclusivo sistema de escovas). Os diâmetros disponíveis à partir de 10 mm até 50 mm. Todos os modelos tem passos variados, favor consultar a NSK ou sua rede de distribuição para maiores informações.

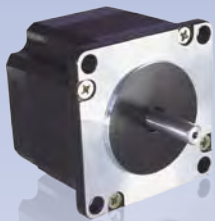
## 2- Precisão

Esta corresponde à faixa padrão (C-10) conforme JIS B1191. Com um erro acumulativo máximo no passo de  $\pm 0,21\text{mm} - 300\text{mm}$ .



Código da Porca	Diâmetro Nominal d	Passo l	Diâmetro das esferas Dw	B.C.D. d <sub>m</sub>	Número de Voltas	Capacidade de Carga		Folga Axial Máx.	D.E. D	Comp. L	Dimensões da Porca						Vedações	Dimensão da haste			Código da haste		
						Dinâmica kgf C <sub>d</sub>	Estática kgf C <sub>s</sub>				Dimensão da rosca		Projeção do Tubo		Diâ. da vedação			Diã. mín. dr	Comp. da haste l <sub>s</sub>				
											M	B	U	V	R	S				T			
RNCT1003A3.5	10	3	2,381	10,65	3,5 x 1	385	685	0,10	20	38	M18 x 1,0	10	15	15	7	-	-	Não	8	400	800	RS 1003A	
RNCT1404A3.5	14	4	2,778 (7/64)	14,5	3,5 x 1	545	1100	0,10	25	43	M24 x 1,0	10	19	20	7	-	-	Não	11,5	500	1000	RS 1404A	
RNCT1405A2.5	14	5	3,175 (1/8)	14,5	2,5 x 1	535	990	0,10	30	45	M26 x 1,5	10	22	21	8	-	-	Não	11	500	1000	RS 1405A	
RNCT1808A3.5 RNCT1808A3.5S	18	8	4,762 (3/16)	18,5	3,5 x 1	1350	2630	0,15	34	58	M32 x 1,5	12	27	27	14	-	2,5	Não Sim	13,5	500	1000	1500	RS 1808A
RNCT2005A2.5 RNCT2005A2.5S	20	5	3,175 (1/8)	20,5	2,5 x 1	650	1450	0,10	40	48	M36 x 1,5	12	28	27	10	-	2,5	Não Sim	17	500	1000	2000	RS 2005A
RNCT2505A5 RNCT2505A5S	25	5	3,175 (1/8)	25,5	2,5 x 2	1310	3710	0,10	42	69	M40 x 1,5	15	28	31	10	-	2,5	Não Sim	22	1000	2000	2500	RS 2505A
RNCT2510A5 RNCT2510A5S	25	10	6,350 (1/4)	26	2,5 x 2	3240	7170	0,20	44	92	M42 x 1,5	15	34	37	17	-	2,5	Não Sim	19	1000	2000	2500	RS 2510A
RNCT2806A5 RNCT2806A5S	28	6	3,175 (1/8)	28,5	2,5 x 2	1380	4140	0,10	50	79	M45 x 1,5	15	33	34	10	-	2,5	Não Sim	25	1000	2000	2500	RS 2806A
RNCT3210A5 RNCT3210A5S	32	10	6,350 (1/4)	33,75	2,5 x 2	3640	9410	0,20	55	97	M50 x 1,5	18	39	42	17	-	2,5	Não Sim	27	1000	2000	3000	RS 3210A
RNCT3610A5 RNCT3610A5S	36	10	6,350 (1/4)	37	2,5 x 2	3890	10400	0,20	60	98	M55 x 2,0	18	42	46	17	-	3	Não Sim	30	1000	2000	3000	RS 3610A
RNCT4010A7 RNCT4010A7S	40	10	6,350 (1/4)	41,75	3,5 x 2	5460	16800	0,20	65	125	M60 x 2,0	25	44	50	20	-	3	Não Sim	35	2000	3000	4000	RS 4010A
RNCT4512A5 RNCT4512A5S	45	12	7,144 (9/32)	46,5	2,5 x 2	5060	15000	0,23	70	124	M65 x 2,0	30	47	55	20	-	3	Não Sim	39	2000	3000	4000	RS 4512A
RNCT5010A7 RNCT5010A7S	50	10	6,350 (1/4)	51,75	3,5 x 2	6060	21000	0,20	80	140	M75 x 2,0	40	52	59	20	-	3	Não Sim	45	2000	3000	4000	RS 5010A
RNCT5016A5 RNCT5016A5S	50	16	9,525 (3/8)	52	2,5 x 2	10200	29900	0,23	85	158	M80 x 2,0	40	57	63	25	-	3	Não Sim	42	2000	3000	4000	RS 5016A

### 5718



- High Torque
- High Resolution
- Custom Windings Available (No Additional Cost)

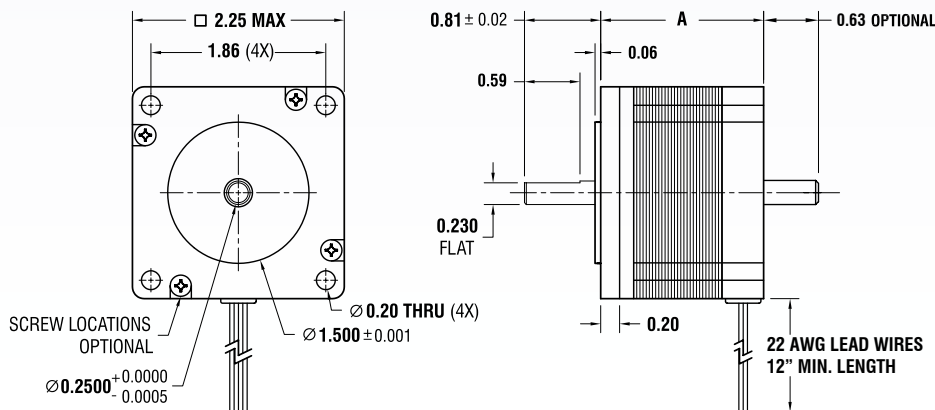
### ■ SPECIFICATIONS

BIPOLAR	Dimension "A" Max	Model #	Amps/Phase	Torque oz-in	Torque N-m	Resistance Ohm/Phase	Inductance mH/Phase	Inertia oz-in <sup>2</sup>	Weight Lbs.	Number of Leads
1.74" 44.2 mm		5718X-01S	1.40	100.0	0.71	2.8	5.6	0.70	1.05	4
		5718X-01P	2.80	100.0	0.71	0.7	1.4	0.70	1.05	4
		5718X-05S	0.70	100.0	0.71	10.0	16.8	0.70	1.05	4
		5718X-05P	1.40	100.0	0.71	2.5	4.2	0.70	1.05	4
		5718X-15S	2.10	100.0	0.71	1.2	1.6	0.70	1.05	4
		5718X-15P	4.20	100.0	0.71	0.3	0.4	0.70	1.05	4
2.2" 55.9 mm		5718M-02S	2.10	173.0	1.29	1.8	5.2	1.50	1.50	4
		5718M-02P	4.20	173.0	1.29	0.5	1.4	1.50	1.50	4
		5718M-04S	0.70	173.0	1.29	14.0	42.3	1.50	1.50	4
		5718M-04P	1.40	173.0	1.29	3.5	10.6	1.50	1.50	4
		5718M-05S	1.40	173.0	1.29	3.6	10.0	1.50	1.50	4
		5718M-05P	2.80	173.0	1.29	0.9	2.5	1.50	1.50	4
3.08" 78.2 mm		5718L-01S	1.40	294.0	2.08	4.5	15.3	2.60	2.20	4
		5718L-01P	2.80	294.0	2.08	1.1	3.8	2.60	2.20	4
		5718L-03S	2.10	294.0	2.08	2.4	7.0	2.60	2.20	4
		5718L-03P	4.20	294.0	2.08	0.6	1.8	2.60	2.20	4
		5718L-04S	3.30	294.0	2.08	1.0	5.2	2.60	2.20	4
		5718L-04P	6.50	294.0	2.08	0.3	1.3	2.60	2.20	4

UNIPOLAR	Dimension "A" Max	Model #	Amps/Phase	Torque oz-in	Torque N-m	Resistance Ohm/Phase	Inductance mH/Phase	Inertia oz-in <sup>2</sup>	Weight Lbs.	Number of Leads
1.74" 44.2 mm		5718X-01	2.00	72.0	0.51	1.4	1.4	0.70	1.05	6
		5718X-05	1.00	72.0	0.51	5.0	4.2	0.70	1.05	6
		5718X-15	3.00	72.0	0.51	0.6	0.4	0.70	1.05	6
2.2" 55.9 mm		5718M-02	3.00	130.0	0.92	0.9	1.4	1.50	1.50	6
		5718M-04	1.00	130.0	0.92	7.0	10.6	1.50	1.50	6
		5718M-05	2.00	130.0	0.92	1.8	2.5	1.50	1.50	6
3.08" 78.2 mm		5718L-01	2.00	210.0	1.48	2.3	3.8	2.60	2.20	6
		5718L-03	3.00	210.0	1.48	1.2	1.8	2.60	2.20	6
		5718L-04	4.67	210.0	1.48	0.5	1.3	2.60	2.20	6

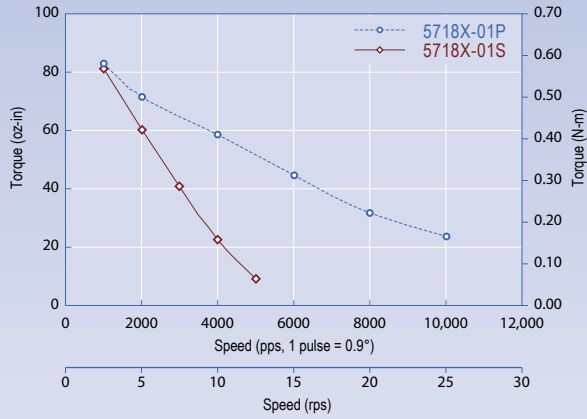
- \* Please complete our application data sheet for different windings.
- \* Power supply voltage can be any value as long as the driver output current is controlled at the rated current.
- \* Call Lin Engineering for additional bipolar torque curves.
- \* Performance, use, and appearance specifications of the products listed here are subject to change without notice.
- \* For operating temperatures, see page 94.

### ■ DIMENSIONS (inches)

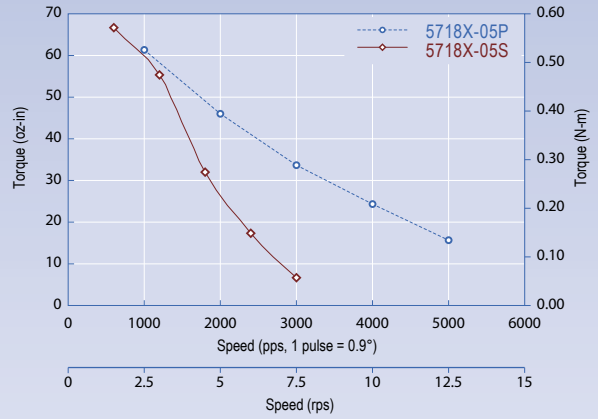


# TORQUE CURVES

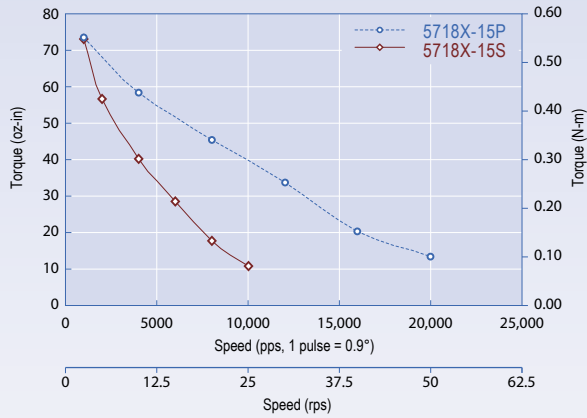
**5718X-01S** 24vDC, 1.4 Amps/Phase, Bipolar Series, 1/2 Stepping  
**5718X-01P** 24vDC, 2.8 Amps/Phase, Bipolar Parallel, 1/2 Stepping



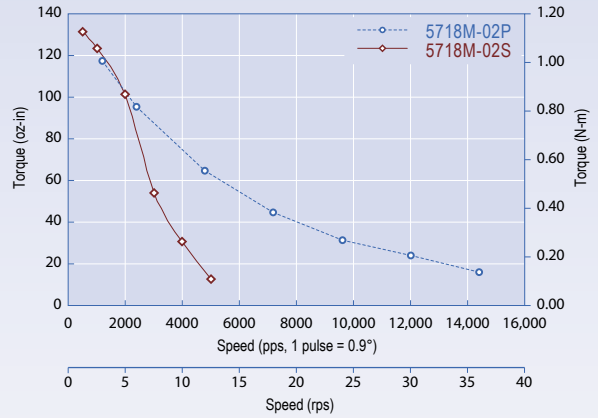
**5718X-05S** 24vDC, 0.7 Amps/Phase, Bipolar Series, 1/2 Stepping  
**5718X-05P** 24vDC, 1.4 Amps/Phase, Bipolar Parallel, 1/2 Stepping



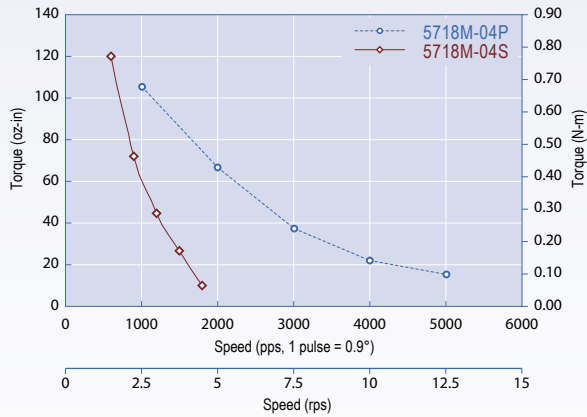
**5718X-15S** 24vDC, 2.1 Amps/Phase, Bipolar Series, 1/2 Stepping  
**5718X-15P** 24vDC, 4.2 Amps/Phase, Bipolar Parallel, 1/2 Stepping



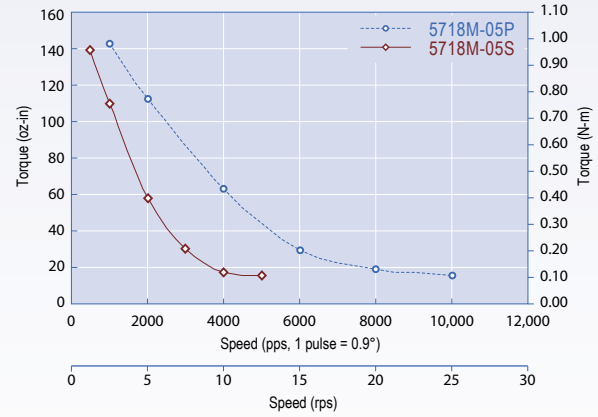
**5718M-02S** 24vDC, 2.1 Amps/Phase, Bipolar Series, 1/2 Stepping  
**5718M-02P** 24vDC, 4.2 Amps/Phase, Bipolar Parallel, 1/2 Stepping



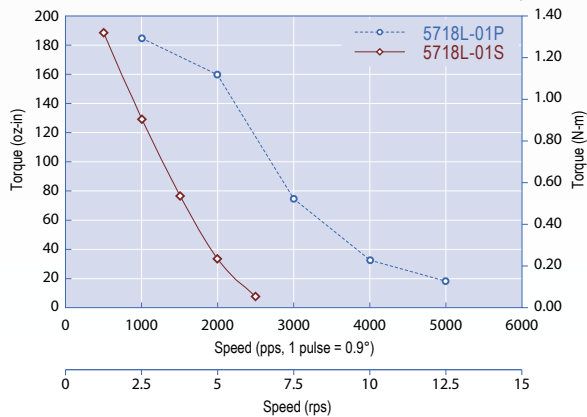
**5718M-04S** 24vDC, 0.7 Amps/Phase, Bipolar Series, 1/2 Stepping  
**5718M-04P** 24vDC, 1.4 Amps/Phase, Bipolar Parallel, 1/2 Stepping



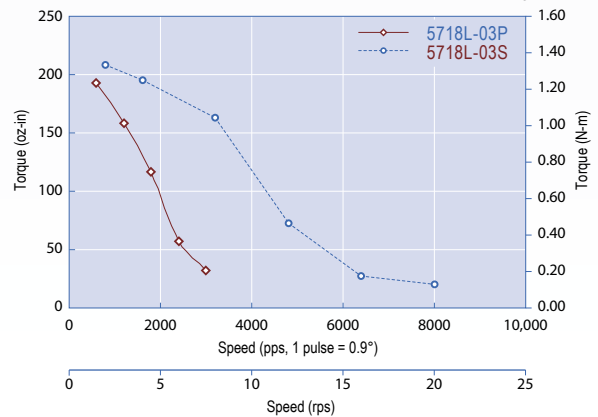
**5718M-05S** 24vDC, 1.4 Amps/Phase, Bipolar Series, 1/2 Stepping  
**5718M-05P** 24vDC, 2.8 Amps/Phase, Bipolar Parallel, 1/2 Stepping



**5718L-01S** 24vDC, 1.4 Amps/Phase, Bipolar Series, 1/2 Stepping  
**5718L-01P** 24vDC, 2.8 Amps/Phase, Bipolar Parallel, 1/2 Stepping



**5718L-03S** 24vDC, 2.1 Amps/Phase, Bipolar Series, 1/2 Stepping  
**5718L-03P** 24vDC, 4.2 Amps/Phase, Bipolar Parallel, 1/2 Stepping



1.8°  
SIZE 23

INTEGRATED  
MOTORS

CUSTOM  
DESIGNS

ACCESSORIES

RMS  
TECHNOLOGIES

TRINAMIC



# DC Power Supply

---

## HY3002D/HY3003D/HY3005D



Feature:

\*High-stabilized constant voltage and current. Voltage & current can be adjusted from zero to certain value.

\*Current restricted protection and short-circuit protection is provided

\*Double power can be used both series and parallel connection, series voltage or parallel current is the sum value of double power and 3-1/2 digit 0.5 inch display or analogue display is contained.

Two 3-1/2 digit LCD Display, accuracy: Voltage +/- 1% + 2 digits, Current: +/- 1.5% + 2digits

Size: 291 X 158 X 136mm

Weight: 3-6 Kg

	HY3002D	HY3003D	HY3005D
Input Voltage	110V/220V +/- 10% AC		
Output Voltage	0 - 30V		
Output Current	0 - 2A	0 - 3A	0 - 5V
Source Effect	< = 0.02% + 1mV		
Load Effect	< = 0.01% + 5mV		
Ripple & Noise	< = 1mVms		

# DC Power Supply

---

## HY3002D-2/HY3003D-2/HY3005D-2



Four 3-1/2 digit LCD Display, accuracy: Voltage +/- 1% + 2 digits, Current: +/- 1.5% + 2digits

	HY3002D-2	HY3003D-2	HY3005D-2
Input Voltage	110V/220V +/- 10% AC		
Output Voltage	2 x 0 - 30V		
Output Current	2 x 0 - 2A	2 x 0 - 3A	2 x 0 - 5V
Source Effect	< = 0.02% + 1mV		
Load Effect	< = 0.01% + 5mV		
Ripple & Noise	< = 1mVms		

## HY3002D-3/HY3003D-3/HY3005D-3



Four 3-1/2 digit LCD Display, accuracy: Voltage +/- 1% + 2 digits, Current: +/- 1.5% + 2digits

	HY3002D-3	HY3003D-3	HY3005D-3
Input Voltage	110V/220V +/- 10% AC		
Output Voltage	2 x 0 - 30V		
Output Current	2 x 0 - 2A	2 x 0 - 3A	2 x 0 - 5V
Source Effect	< = 0.02% + 1mV		
Load Effect	< = 0.01% + 5mV		
Fixed Output	5V/3A		
Ripple & Noise	< = 1mVms		



## SensoLyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit \*Colorimetric\*

<b>Catalog #</b>	<b>72146</b>
<b>Kit Size</b>	500 Assays (96-well plate)

- **Optimized Performance:** This kit is optimized to detect alkaline phosphatase activity
- **Enhanced Value:** It provides ample reagents to perform 500 assays in a 96-well format.
- **High Speed:** The entire process can be completed in one hour.
- **Assured Reliability:** Detailed protocol and references are provided

### Kit Components, Storage and Handling

Component	Description	Quantity
Component A	pNPP, colorimetric alkaline phosphatase substrate	25 mL
Component B	10X Assay buffer	50 mL
Component C	Stop solution	25 mL
Component D	Triton-X-100	500 µL
Component E	Alkaline Phosphatase Standard, Calf Intestine	10 µg/mL, 50 µL

### Other Materials Required (but not provided)

- 96-well microplate: Clear microplate provides better signal to noise ratio
- Absorbance plate reader: Capable of detecting absorbance at 405 nm.

### Storage and Handling

- Store all components at 4°C.
- Keep Component A away from light.

---

## Introduction

Changes in alkaline phosphatase level and activity are involved in a variety of physiological and pathological events, such as bone development,<sup>1</sup> bone-related diseases,<sup>2</sup> gestation related diseases,<sup>3</sup> inflammatory bowel disease,<sup>4</sup> post-parathyroidectomy stage,<sup>5</sup> and drug toxicity.<sup>6</sup> Alkaline phosphatase is widely used in ELISA for conjugation with secondary antibody and as a reporter for gene expression studies.

The SensoLyte® *p*NPP Alkaline Phosphatase Assay Kit provides a convenient colorimetric assay for detecting alkaline phosphatase in biological samples and in ELISA with alkaline phosphatase conjugated secondary antibody or streptavidin by using colorimetric *p*NPP (*p*-Nitrophenyl phosphate) phosphatase substrate. Upon dephosphorylation, *p*NPP turns yellow and can be detected at absorbance=405 nm.

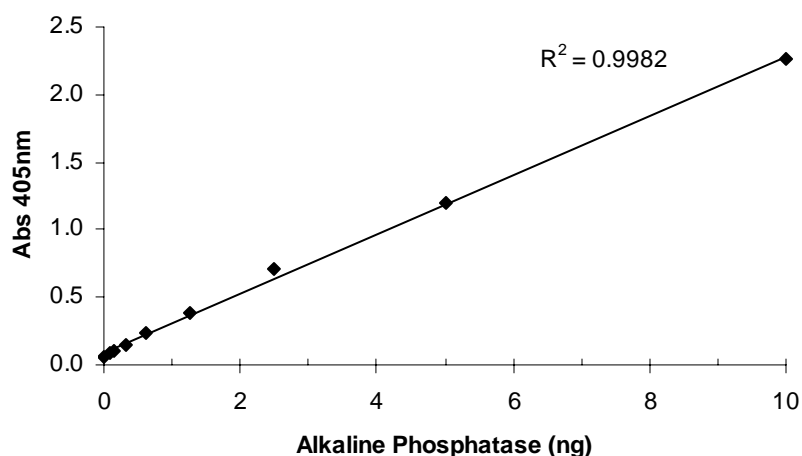


Figure 1. Detection of alkaline phosphatase with the SensoLyte® *p*NPP Alkaline Phosphatase Assay Kit.

The alkaline phosphatase enzyme at each dilution was mixed with *p*NPP substrate, and then incubated at room temperature for 1 hr. Absorbance was recorded at 405 nm (Ultra Microplate Reader EL808, Bio-Tek Instruments, Inc).

---

## Protocol

Note 1: Warm all kit components to room temperature before starting the experiment.

Note 2: Please use Protocol A or B based on your needs.

### **Protocol A. Detecting alkaline phosphatase activity in biological samples**

#### **1. Prepare working solutions.**

Note: For preparation of biological samples containing alkaline phosphatase, please refer to Appendix I.

1.1 pNPP alkaline phosphatase substrate (Component A): Ready to use.

1.2 Prepare alkaline phosphatase dilution buffer: Dilute 10X assay buffer (Component B) to 1X Assay buffer with deionized water. Add bovine serum albumin to 1 mg/mL.

Note: Bovine serum albumin is not included in the kit.

1.3 Alkaline phosphatase standard: Dilute alkaline phosphatase standard (10 µg/mL - Component E) to 0.2 µg/mL (1:50) in dilution buffer. Then make two-fold serial dilutions to get the concentration of 100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, and 0 ng/mL of alkaline phosphatase solution.

Note: Unused portion of diluted alkaline phosphatase solution should be discarded.

#### **2. Set up the enzymatic reaction.**

2.1 Add 50 µL/well of biological samples containing alkaline phosphatase. Use alkaline phosphatase dilution buffer (Step 1.2) to dilute samples.

2.2 Set up alkaline phosphatase standard (optional): Add 50 µL of serially diluted alkaline phosphatase standard solution from 200 to 0 ng/mL to the wells. The final amounts of alkaline phosphatase standard are 10, 5, 2.5, 1.2, 0.6, 0.3, 0.15, and 0 nanogram/well.

#### **3. Detect alkaline phosphatase activity.**

3.1 Add 50 µL of pNPP substrate solution into each well. Mix the reagents by gently shaking the plate for 30 sec.

3.2 Measure absorbance:

- For kinetic reading: Immediately start measuring absorbance at 405 nm and continuously record data every 5 min for 30 to 60 min.
- For end-point reading: Incubate reaction at the desired temperature for 30-60 min. Optional: Add 50 µL of Stop Solution (Component C) into each well. Shake the plate on a plate shaker for 1 min before the reading. Measure absorbance at 405 nm.

## **Protocol B. Detecting alkaline phosphatase activity in ELISA**

### **1. Prepare working solutions.**

Note: For ELISA plate preparation, please refer to Appendix II.

**1.1** 1X assay buffer: Dilute 10X assay buffer (Component B) to 1X assay buffer with deionized water.

**1.2** pNPP alkaline phosphatase substrate working solution: Add 5 mL of pNPP substrate solution (Component A) to 5 mL of 1X assay buffer. This amount of substrate is enough for one 96-well plate.

Note: Prepare fresh working solutions for each experiment.

### **2. Detect alkaline phosphatase activity.**

**2.2** Add 100  $\mu$ L of pNPP substrate working solution from step 1.2 into each well. Mix the reagents by gently shaking the plate for 30 sec.

**2.3** Measure absorbance: Incubate reaction at the desired temperature for 30-60 min. Add 50  $\mu$ L of Stop Solution (Component C) into each well. Measure absorbance at 405 nm.

---

## **Appendix I**

### **Prepare cell extract for alkaline phosphatase**

- Prepare 1X assay buffer by adding 1 mL of 10X assay buffer (Component B) to 9 mL of deionized water.
- Gently wash cells twice with 1X assay buffer.
- Add 20  $\mu$ L of Triton X-100 (Component D) to 10 mL of 1X assay buffer, mix well. Add an appropriate amount of 1X assay buffer to cells or cell pellet. Scrape off the adherent cells or resuspend the cell pellet. Collect the cell suspension in a microcentrifuge tube.
- Incubate the cell suspension at 4°C for 10 min under agitation.
- Centrifuge the cell suspension at 2500 X g for 10 min at 4°C.
- Collect the supernatant for alkaline phosphatase assay.

### **Prepare tissue extract for alkaline phosphatase**

- Prepare 1X assay buffer by adding 20  $\mu$ L of Triton-X 100 (Component D) and 1 mL of 10X assay buffer (Component B) to 9 mL of deionized water.
- Homogenize tissue in 1X assay buffer, and then centrifuge for 15 min at 10,000x g at 4°C. Collect the supernatant for the alkaline phosphatase assay.

---

## Appendix II: General ELISA protocol

### 1. Required buffers:

1. Coating buffer: 1.59 g of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 2.93 g of NaHCO<sub>3</sub> in 1 L of deionized H<sub>2</sub>O. The pH is 9.6 without adjustment.
2. Tris-buffered saline (TBS): 8.76 g of NaCl, 12.1 g of Tris in 800 mL of deionized H<sub>2</sub>O. Adjust pH to 7.4 with HCl. Add H<sub>2</sub>O to 1L.
3. Blocking buffer: Add 10 g of BSA and 0.2 mL of Tween<sup>®</sup>-20 into 1 L of TBS.
4. EIA buffer: Add 1 g of BSA and 0.2 mL Tween<sup>®</sup>-20 into 1 L of TBS.
5. Wash buffer: Add 0.2 mL of Tween<sup>®</sup>-20 into 1 L of TBS.

### 2. Required ELISA microplate:

Use clear, high-binding ELISA plates for better signal to noise ratio.

### 3. ELISA:

1. Coating: Add 100 µL of capture antibody to each well of the 96-well plate at a concentration of 2-10 µg/mL in coating buffer. Seal the plate with plate sealer and incubate at 4°C overnight.
2. Washing: Discard the solution and wash the plate with 200 µL of wash buffer per well three to five times. Soak the plate during the last wash step for 5 min. Pad dry on paper towel.
3. Blocking: Add 200 µL of blocking buffer and incubate 1h at room temperature.
4. Washing: Repeat Step 2.
5. Add sample: Dilute sample to be tested in EIA buffer to an appropriate concentration. Add 100 µL of the diluted sample to each well and incubate at room temperature for 1h on a plate shaker.
6. Washing: Repeat Step 2.
7. Add detection antibody: Dilute alkaline phosphatase conjugated detection antibody in EIA buffer to the appropriate concentration (1:500 to 1:5000 dilution). Add 100 µL of diluted antibody to each well and incubate at room temperature for 1h on a plate shaker.
8. Washing: Repeat Step 2.
9. Detection by substrate: Plate is now ready for pNPP detection (refer to Protocol B).

---

## References

1. Kotobuki, N. et al. *Cell Transplant.* 13, 377 (2004).
2. Wyckoff, M.H. et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1233 (2004).
3. Boronkai, A. et al. *J. Clin. Pathol.* 58, 72 (2005).
4. Sanchez, M. et al. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2317 (2004).
5. Morrone, L.F. et al. *Ann. Ital. Med. Int.* 19, 189 (2004).
6. Papaldo, P. et al. *Cancer Invest.* 22, 650 (2004).

## Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits

**Table 1.** Contents and Storage Information.

Material	Amount	Concentration	Storage	Stability
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent (Component A)	1 mL in 1 vial (P7589) or in 10 vials of 100 µL each (P11496)	Solution in DMSO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2–6°C</li> <li>• Desiccate</li> <li>• Protect from light</li> </ul>	When stored as directed, product stable for at least 6 months
20X TE (Component B)	25 mL	200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5	• Room temperature *	
Lambda DNA standard (Component C)	1 mL	100 µg/mL in TE	• 2–6°C *	

\* For long-term storage, both the 20X TE and lambda DNA standard can be stored at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .

**Number of Labelings:** For either the kits or the stand-alone reagent, sufficient reagent is supplied for 200 assays using an assay volume of 2 mL and the protocol described below. Note that the assay volume is dependent on the instrument used to measure fluorescence; with a microplate reader and a 96-well microplate, the assay volume is reduced to 200 µL and 2,000 assays are possible.

**Spectral Data:** Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent 502/523 nm, bound to nucleic acids

### Introduction

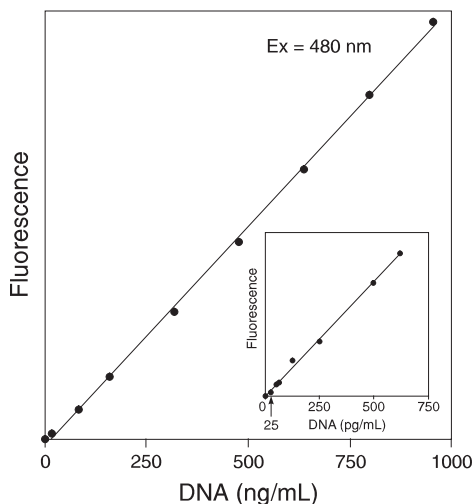
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent is an ultrasensitive fluorescent nucleic acid stain for quantitating double-stranded DNA (dsDNA) in solution. Detecting and quantitating small amounts of DNA is extremely important in a wide variety of biological applications. These include standard molecular biology techniques, such as synthesizing cDNA for library production and purifying DNA fragments for subcloning, as well as diagnostic techniques, such as quantitating DNA amplification products and detecting DNA molecules in drug preparations. The Quant-iT™ PicoGreen® reagent has recently been used to quantitate PCR amplification yields in a method for direct cycle sequencing of PCR products.<sup>1</sup>

The most commonly used technique for measuring nucleic acid concentration is the determination of absorbance at 260 nm ( $A_{260}$ ). The major disadvantages of the absorbance method are the large relative contribution of nucleotides and single-stranded nucleic acids to the signal, the interference caused by contaminants commonly found in nucleic acid preparations, the inability to distinguish between DNA and RNA, and the relative insensitivity of the assay (an  $A_{260}$  of 0.1 corresponds to a 5 µg/mL dsDNA solution). Hoechst (bisbenzimidazole) dyes are sensitive fluorescent nucleic acid stains that circumvent many of these problems. The Hoechst 33258-based assay is somewhat selective for dsDNA, does not show significant fluorescence enhancement in the presence of proteins, and allows the detection and quantitation of DNA concentrations as low as 10 ng/mL DNA.<sup>2</sup> Molecular Probes' proprietary YO-PRO®-1 and YOYO®-1 nucleic acid stains have also been used to quantitate nucleic acids, allowing the detection of about 0.5 ng/mL DNA in solution.<sup>3,4</sup>

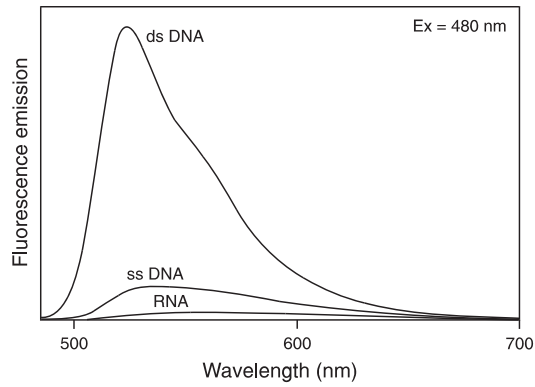


Our Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent enables researchers to quantitate as little as 25 pg/mL of dsDNA (50 pg dsDNA in a 2 mL assay volume) with a standard spectrofluorometer and fluorescein excitation and emission wavelengths. This sensitivity exceeds that achieved with the Hoechst 33258–based assay by 400-fold. Using a fluorescence microplate reader, we can detect as little as 250 pg/mL dsDNA (50 pg in a 200 µL assay volume). The standard Quant-iT™ PicoGreen® assay protocol is also simpler than that for Hoechst 33258 because a single concentration of the Quant-iT™ PicoGreen® reagent allows detection over the full dynamic range of the assay. In order to achieve more than two orders of magnitude in dynamic range with Hoechst-based assays, two different dye concentrations are recommended. In contrast, the linear detection range of the Quant-iT™ PicoGreen® assay in a standard fluorometer extends over more than four orders of magnitude in DNA concentration—from 25 pg/mL to 1,000 ng/mL—with a single dye concentration (Figure 1). We have shown that this linearity is maintained in the presence of several compounds that commonly contaminate nucleic acid preparations, including salts, urea, ethanol, chloroform, detergents, proteins, and agarose.

Our assay protocol was also developed to minimize the fluorescence contribution of RNA and single-stranded DNA (ssDNA) (Figure 2). Although the Hoechst 33258–based method is not significantly affected by the presence of RNA when the assay is carried out in the recommended high-salt buffer, we have found that Hoechst 33258 does exhibit a large fluorescence enhancement with ssDNA under these conditions. Furthermore, when the Hoechst 33258–based assay is carried out in TE alone (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5, with no NaCl added), RNA contributes a significant fluorescence signal. Using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent and the recommended assay protocol, researchers can quantitate dsDNA in the presence of equimolar concentrations of ssDNA and RNA with minimal effect on the quantitation results.



**Figure 1.** Dynamic range and sensitivity of the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay. Calf thymus DNA was added to cuvettes containing Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent diluted in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 (TE). The samples were excited at 480 nm and the fluorescence emission intensity was measured at 520 nm using a spectrofluorometer. Fluorescence emission intensity was then plotted versus DNA concentration; the inset shows an enlargement of the results obtained with DNA concentrations between zero and 750 pg/mL.



**Figure 2.** Fluorescence enhancement of Quant-iT™ PicoGreen® reagent upon binding dsDNA, ssDNA, and RNA. Samples containing 500 ng/mL calf thymus DNA, M13 ssDNA, or *E. coli* ribosomal RNA were added to cuvettes containing Quant-iT™ PicoGreen® reagent in TE. Samples were excited at 480 nm and the fluorescence emission spectra were collected using a spectrofluorometer. Emission spectra for samples containing dye and nucleic acids, as well as for dye alone (baseline), are shown.

## Before You Begin

---

The Quant-iT™ PicoGreen® reagent supplied in the kits is exactly the same as the reagent sold separately.

### Handling and Disposal

Allow the Quant-iT™ PicoGreen® reagent to warm to room temperature before opening the vial.

### Caution:

No data are available addressing the mutagenicity or toxicity of Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent. Because this reagent binds to nucleic acids, it should be treated as a potential mutagen and handled with appropriate care. The DMSO stock solution should be handled with particular caution as DMSO is known to facilitate the entry of organic molecules into tissues. Dispose of Quant-iT™ PicoGreen® reagent in accordance with local regulations.

### Preparing the Assay Buffer

TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) is used below for diluting the Quant-iT™ PicoGreen® reagent, for diluting DNA samples, and in the assay itself. Because the Quant-iT™ PicoGreen® dye is an extremely sensitive detection reagent for dsDNA, it is imperative that the TE solution used be free of contaminating nucleic acids. The 20X TE buffer included in the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kits is certified to be nucleic acid-free and DNase-free. Prepare a 1X TE working solution by diluting the concentrated buffer 20-fold with sterile, distilled, DNase-free water.

### Preparing the Reagent

On the day of the experiment, prepare an aqueous working solution of the Quant-iT™ PicoGreen® reagent by making a 200-fold dilution of the concentrated DMSO solution in TE. For example, to prepare enough working solution to assay 20 samples in a 2 mL final volume, add 100  $\mu$ L Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent to 19.9 mL TE. We recommend preparing this solution in a plastic container rather than glass, as the reagent may adsorb to glass surfaces. Protect the working solution from light by covering it with foil or placing it in the dark, as the Quant-iT™ PicoGreen® reagent is susceptible to photodegradation. *For best results, this solution should be used within a few hours of its preparation.*

### DNA Standard Curve

**1.1** Prepare a 2 µg/mL stock solution of dsDNA in TE. Determine the DNA concentration on the basis of absorbance at 260 nm ( $A_{260}$ ) in a cuvette with a 1 cm pathlength; an  $A_{260}$  of 0.04 corresponds to 2 µg/mL dsDNA solution. For a standard curve, we commonly use bacteriophage lambda or calf thymus DNA, although any purified dsDNA preparation may be used. The lambda DNA standard, provided at 100 µg/mL in the Quant-iT™ PicoGreen® Kits, can simply be diluted 50-fold in TE to make the 2 µg/mL working solution. For example, 30 µL of the DNA standard mixed with 1.47 mL of TE will be sufficient for the standard curve described below. It is sometimes preferable to prepare the standard curve with DNA similar to the type being assayed; e.g., long or short linear DNA fragments when quantitating similar-sized restriction fragments or plasmid when quantitating plasmid DNA. However, we have found that most linear dsDNA molecules yield approximately equivalent signals, regardless of fragment length. Our results have shown that the Quant-iT™ PicoGreen® assay remains linear in the presence of several compounds that commonly contaminate nucleic acid preparations, although the signal intensity may be affected (Table 2). Thus, to serve as an effective control, the dsDNA solution used to prepare the standard curve should be treated the same way as the experimental samples and should contain similar levels of such compounds. To create a five-point standard curve from 1 ng/mL to 1 µg/mL, proceed to step 1.2. For a low-range standard curve from 25 pg/mL to 25 ng/mL, prepare a 40-fold dilution of the 2 µg/mL DNA solution to yield a 50 ng/mL DNA stock solution and proceed to step 1.5.

**1.2** For the **high-range** standard curve, dilute the 2 µg/mL DNA stock solution into disposable cuvettes (or plastic test tubes for transfer to quartz cuvettes) as shown in Table 3. Then add 1.0 mL of the aqueous working solution of Quant-iT™ PicoGreen® reagent (prepared in *Reagent Preparation*) to each cuvette. Mix well and incubate for 2 to 5 minutes at room temperature, protected from light.

**1.3** After incubation, measure the sample fluorescence using a spectrofluorometer or fluorescence microplate reader and standard fluorescein wavelengths (excitation ~480 nm, emission ~520 nm). To ensure that the sample readings remain in the detection range of the fluorometer, the instrument's gain should be set so that the sample containing the highest DNA concentration yields a fluorescence intensity near the fluorometer's maximum. To minimize photobleaching effects, keep the time for fluorescence measurement constant for all samples.

**1.4** Subtract the fluorescence value of the reagent blank from that of each of the samples. Use corrected data to generate a standard curve of fluorescence versus DNA concentration (see Figure 1).

**1.5** For the **low-range** standard curve—from 25 pg/mL to 25 ng/mL—dilute the 50 ng/mL DNA stock solution (prepared in step 1.1) into disposable cuvettes (or plastic test tubes for transfer to quartz cuvettes) as shown in Table 4. Add 1.0 mL of the aqueous working solution of Quant-iT™ PicoGreen® reagent (prepared in *Reagent Preparation*) to each cuvette. Mix well and incubate for 2 to 5 minutes at room temperature, protected from light. Continue with steps 1.3 and 1.4. Adjust the fluorometer gain to accommodate the lower fluorescence signals.

**Table 2.** Effects of several compounds that commonly contaminate nucleic acid preparations on the signal intensity of the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay.

Compound	Maximum Acceptable Concentration	% Signal Change*
Salts		
Ammonium acetate	50 mM	3% decrease
Sodium acetate	30 mM	3% increase
Sodium chloride	200 mM	30% decrease
Zinc chloride	5 mM	8% decrease
Magnesium chloride	50 mM	33% decrease
Urea	2 M	9% increase
Organic Solvents		
Phenol	0.1%	13% increase
Ethanol	10%	12% increase
Chloroform	2%	14% increase
Detergents		
Sodium dodecyl sulfate	0.01%	1% decrease
Triton X-100	0.1%	7% increase
Proteins		
Bovine serum albumin	2%	16% decrease
IgG	0.1%	19% increase
Other Compounds		
Polyethylene glycol	2%	8% increase
Agarose	0.1%	4% increase

\* The compounds were incubated at the indicated concentrations with Quant-iT™ PicoGreen® reagent in the presence of 500 ng/mL calf thymus DNA. All samples were assayed in a final volume of 200 µL in 96-well microplates using a CytoFluor microplate reader. Samples were excited at 485 nm and fluorescence intensity was measured at 520 nm.

**Table 3.** Protocol for preparing a high-range standard curve.

Volume (µL) of TE	Volume (µL) of 2 µg/mL DNA Stock	Volume (µL) of Diluted Quant-iT™ PicoGreen® Reagent	Final DNA Concentration in Quant-iT™ PicoGreen® Assay
0	1,000	1,000	1 µg/mL
900	100	1,000	100 ng/mL
990	10	1,000	10 ng/mL
999	1	1,000	1 ng/mL
1,000	0	1,000	blank

## Sample Analysis

**2.1** Dilute the experimental DNA solution in TE to a final volume of 1.0 mL in disposable cuvettes or test tubes. You may alter the amount of sample diluted, provided that the final volume remains 1.0 mL. A higher dilution of the experimental sample may diminish the interfering effect of certain contaminants. However, extremely small sample volumes should be avoided because they are difficult to pipet accurately. See *Eliminating Single-Stranded Nucleic Acids from Samples* (below) for information on eliminating RNA and ssDNA from the sample.

**2.2** Add 1.0 mL of the aqueous working solution of the Quant-iT™ PicoGreen® reagent to each sample. Incubate for 2 to 5 minutes at room temperature, protected from light.

**2.3** Measure the fluorescence of the sample using instrument parameters that correspond to those used when generating your standard curve (see step 1.3). To minimize photobleaching effects, keep the time for fluorescence measurement constant for all samples.

2.4 Subtract the fluorescence value of the reagent blank from that of each of the samples. Determine the DNA concentration of the sample from the standard curve generated in *DNA Standard Curve*.

2.5 The assay may be repeated using a different dilution of the sample to confirm the quantitation results.

### Eliminating Single-Stranded Nucleic Acids from Samples

We have found that dsDNA can be quantitated in the presence of equimolar concentrations of single-stranded nucleic acids with minimal interference. Table 5 shows the concentrations of RNA or ssDNA that, for a given dsDNA concentration, result in less than a 10% change in the signal intensity using the Quant-iT™ PicoGreen® assay protocol. Fluorescence due to Quant-iT™ PicoGreen® reagent binding to RNA at high concentrations can be eliminated by treating the sample with DNase-free RNase.<sup>5</sup> The use of RNase A/RNase T1 with S1 nuclease will eliminate all single-stranded nucleic acids and ensure that the entire sample fluorescence is due to dsDNA.<sup>5</sup>

**Table 4.** Protocol for preparing a low-range standard curve.

Volume (μL) of TE	Volume (μL) of 50 ng/mL DNA Stock	Volume (μL) of Diluted Quant-iT™ PicoGreen® Reagent	Final DNA Concentration in Quant-iT™ PicoGreen® Assay
0	1,000	1,000	25 ng/mL
900	100	1,000	2.5 ng/mL
990	10	1,000	250 pg/mL
999	1	1,000	25 pg/mL
1,000	0	1,000	blank

**Table 5.** Sensitivity of the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay for quantitating dsDNA in the presence of single-stranded nucleic acids.

[dsDNA]*	[RNA] (amount relative to dsDNA)		[ssDNA] (amount relative to dsDNA)	
1 μg/mL	10 μg/mL	(10X)	300 ng/mL	(0.3X)
500 ng/mL	500 ng/mL	(1X)	50 ng/mL	(0.1X)
10 ng/mL	100 ng/mL	(10X)	30 ng/mL	(3X)
5 ng/mL	50 ng/mL	(10X)	15 ng/mL	(3X)
100 pg/mL	1 ng/mL	(10X)	1 ng/mL	(10X)
50 pg/mL	500 pg/mL	(10X)	500 pg/mL	(10X)

\* For several concentrations of dsDNA, we show the concentration of RNA or ssDNA that results in no more than a 10% increase in the sample's signal intensity.

## References

1. Biotechniques 20, 676 (1996); 2. Anal Biochem 102, 344 (1980); 3. Anal Biochem 208, 144 (1993); 4. Biophys J 61, A314 (1992); 5. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

## Product List Current prices may be obtained from our website or from our Customer Service Department.

---

Cat #	Product Name	Unit Size
P7589	Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit .....	1 kit
P11496	Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit *10 × 100 µL* .....	1 kit
P7581	Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent .....	1 mL
P11495	Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent *10 × 100 µL* .....	10 × 100 µL

## Contact Information

---

### Molecular Probes, Inc.

29851 Willow Creek Road  
Eugene, OR 97402  
Phone: (541) 465-8300  
Fax: (541) 335-0504

### Customer Service:

6:00 am to 4:30 pm (Pacific Time)  
Phone: (541) 335-0338  
Fax: (541) 335-0305  
probesorder@invitrogen.com

### Toll-Free Ordering for USA:

Order Phone: (800) 438-2209  
Order Fax: (800) 438-0228

### Technical Service:

8:00 am to 4:00 pm (Pacific Time)  
Phone: (541) 335-0353  
Toll-Free (800) 438-2209  
Fax: (541) 335-0238  
probetech@invitrogen.com

### Invitrogen European Headquarters

Invitrogen, Ltd.  
3 Fountain Drive  
Inchinnan Business Park  
Paisley PA4 9RF, UK  
Phone: +44 (0) 141 814 6100  
Fax: +44 (0) 141 814 6260  
Email: euroinfo@invitrogen.com  
Technical Services: eurotech@invitrogen.com

Further information on Molecular Probes products, including product bibliographies, is available from your local distributor or directly from Molecular Probes. Customers in Europe, Africa and the Middle East should contact our office in Paisley, United Kingdom. All others should contact our Technical Service Department in Eugene, Oregon.

Molecular Probes products are high-quality reagents and materials intended for research purposes only. These products must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Please read the Material Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

### Limited Use Label License No. 223: Labeling and Detection Technology

For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) to not transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of the above patents based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402. Tel: (541) 465-8300. Fax: (541) 335-0504.

Several Molecular Probes products and product applications are covered by U.S. and foreign patents and patents pending. All names containing the designation ® are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Copyright 2008, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.