

PRODUÇÃO DE ESTRUTURAS 3D BIOCAMPATÍVEIS DOPADAS COM COMPOSTOS BIOATIVOS

TIAGO CARVALHO MOURA FERREIRA
(Licenciado em Engenharia Biomédica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutor Tiago Gorjão Clara Charters de Azevedo
Doutor Tiago Daniel Pereira Adriano Fernandes

Júri:

Presidente: Doutor Manuel José de Matos
Vogais: Doutora Ana Catarina Cardoso de Sousa
Doutor Tiago Gorjão Clara Charters de Azevedo

novembro de 2025

PRODUÇÃO DE ESTRUTURAS 3D BIOCAMPATÍVEIS DOPADAS COM COMPOSTOS BIOATIVOS

TIAGO CARVALHO MOURA FERREIRA
(Licenciado em Engenharia Biomédica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutor Tiago Gorjão Clara Charters de Azevedo, ISEL/IPL
Doutor Tiago Daniel Pereira Adriano Fernandes, IST/UAB

Júri:

Presidente: Doutor Manuel José de Matos, ISEL/IPL
Vogais: Doutora Ana Catarina Cardoso de Sousa, ISEL/IPL
Doutor Tiago Gorjão Clara Charters de Azevedo, ISEL/IPL

novembro de 2025

Agradecimentos

Quero começar por agradecer aos meus professores ao longo de todo o percurso escolar e em especial aos meus orientadores, quer por todo o conhecimento transmitido, como também pelo tempo e dedicação que demonstraram para me conduzir ao melhor resultado. Um obrigado especial ao professor Tiago Charters de Azevedo, por toda a disponibilidade e assistência na área da impressão, como também por me aconselhar no desenvolvimento deste documento. E ainda ao professor Tiago Fernandes, pela oportunidade de experiência que me passou na área da química, por todo o positivismo e por acreditar no meu trabalho.

Agradeço à professora Catarina Sousa pelo espaço no laboratório e pela facultação dos materiais e reagentes que necessitei durante o tempo do estudo.

Gostava de deixar uma palavra de apreço ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa e ao Instituto Superior Técnico por me permitirem realizar o mestrado em engenharia biomédica e, mais especificamente, esta dissertação sobre dopagem com antibióticos de estruturas impressas em 3D.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Luís, Hugo, Filipa, Carolina, Rafaela e Gonçalo. Foram meses de compromisso, mas também de companheirismo e momentos de partilha. A todos os meus amigos e colegas de mestrado, destacando a Erika, o Daniel, a Rita Canadas e a Rita Estopa, fico eternamente grato por todo o apoio e vivências que jamais vou esquecer.

Não posso deixar de dizer que a minha família tem um papel fundamental naquele que foi e será o meu percurso enquanto estudante e cidadão. Evidenciando os meus pais, um apoio do qual jamais poderia abdicar. Amo-vos!

Por fim, quero dedicar este esforço e trabalho a todas as restantes pessoas que sabem que são importantes na minha vida. A minha última palavra é para alguém que sabe que, por mais longe que esteja, terá sempre um lugar intocável no meu coração.

Declaração de integridade

Declaro que esta dissertação é o resultado da minha investigação pessoal e independente. O seu conteúdo é original e todas as fontes listadas nas referências bibliográficas foram consultadas e estão devidamente mencionadas no texto. Mais declaro que todas as referências científicas e técnicas relevantes para o desenvolvimento do trabalho estão devidamente citadas e constam das referências bibliográficas.

Lisboa, de de

PRODUÇÃO DE ESTRUTURAS 3D BIOCAMPATÍVEIS DOPADAS COM COMPOSTOS BIOATIVOS

Resumo

A procura por novos métodos e formas de produção e aplicação de medicamentos tem crescido com a necessidade de descobrir novos compostos com propriedades específicas.

Considerando este paradigma, a impressão 3D apresenta-se como uma ferramenta importante para o melhoramento de aplicações de medicamentos. Esta permite uma produção de estruturas detalhadas e reproduzíveis, ajustando a composição da pasta de impressão para cumprir a aplicação pretendida.

A realização deste trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de compósitos para impressão 3D, para as quais foram tidas em conta diversos materiais biocompatíveis, com o propósito de elaborar estruturas criadas por múltiplas camadas capazes de incorporar propriedades antibióticas. A sua finalidade consiste em combater ambientes adversos, como é o caso da presença de bactérias que possam provocar infeções.

O desenvolvimento destas estruturas, designadas de *scaffolds*, baseou-se na impressão 3D por extrusão, visando uma produção precisa, com parâmetros manipuláveis e de menor custo. O processo inicia-se com a criação de um modelo 3D que, posteriormente, é renderizado e sujeito a parâmetros de impressão que lhe conferirá determinada organização interna e externa.

Nos testes realizados, o compósito para impressão formado por 37,5% de hidroxiapatite, 38% de sacarose, 0,5% de alginato de sódio e 24% de água originou a estrutura com mais garantias relativamente à impressão 3D.

Procedeu-se à impregnação de sulfanilamida, tentando atribuir propriedades antibióticas a *scaffolds* que se destacavam pela diferença na composição da matriz. Avaliando os resultados da microbiologia, registaram-se as melhores inibições no crescimento de bactérias em estruturas formadas por hidroxiapatite, comparando-as às restantes. Foram ainda realizadas análises SEM e FTIR com o objetivo de caracterizar morfológica e estruturalmente os *scaffolds*. Através da técnica de espectroscopia também foi pretendido identificar a presença do antibiótico nas amostras dopadas.

Palavras-chave:

Impressão 3D; bioimpressão; compósitos de hidroxiapatite; impregnação e libertação de fármaco; *direct-ink-writing*

PRODUCTION OF BIOCOMPATIBLE 3D STRUCTURES DOPED WITH BIOACTIVE COMPOUNDS

Abstract

The search for new methods and forms of drug production and application has grown with the need to discover new compounds with specific properties.

Considering this paradigm, 3D printing is presented as an important tool for the improvement of drug applications. It allows for the production of detailed and reproducible structures, adjusting the composition of the printing paste to meet the intended application.

The purpose of this work is the development of composites for 3D printing, for which various biocompatible materials were considered, with the aim of elaborating multi-layered structures capable of incorporating antibiotic properties. Its finality is to combat adverse environments, such as the presence of bacteria that can cause infections.

The development of these structures, called scaffolds, was based on extrusion 3D printing, aiming for precise, lower-cost production with manipulable parameters. The process begins with the creation of a 3D model, which is then rendered and subjected to printing parameters that will confer a specific internal and external organization.

In the tests carried out, the printing composite formed by 37.5% hydroxyapatite, 38% sucrose, 0.5% sodium alginate, and 24% water resulted in the structure with the most guarantees regarding 3D printing.

Sulfanilamide was impregnated, attempting to attribute antibiotic properties to scaffolds distinguished by the difference in matrix composition. Evaluating the microbiology results, the best inhibitions in bacterial growth were recorded in structures formed by hydroxyapatite, when compared to the others. SEM and FTIR analyses were also carried out to morphologically and structurally characterize the scaffolds. The spectroscopy technique was also intended to identify the presence of the antibiotic in the doped samples.

Keywords:

3D printing; bioprinting; hydroxyapatite composites; drugs impregnation-release; *direct-ink-writing*

Índice

Agradecimentos	i
Declaração de integridade	iii
Resumo	v
Abstract	vii
I. Índice de figuras	xi
II. Índice de tabelas	xiii
III. Lista de siglas e abreviaturas	xv
1. Introdução	1
1.1. Motivação e objetivo do estudo	1
1.2. Organização e estrutura	1
1.3. Impressão 3D e bioimpressão	1
1.4. Técnicas de impressão 3D: características e propriedades	4
1.5. Biomateriais e produção de misturas para impressão	6
1.6. Futuro da bioimpressão 3D	10
1.7. Antibióticos e a sua incorporação nas estruturas impressas	10
2. A evolução da impressão 3D na área da saúde, da bioimpressão e da dopagem das estruturas	13
3. Metodologia	17
3.1. Primeira abordagem à impressão 3D	17
3.2. Tipo de impressão 3D implementado	17
3.3. Características da impressora 3D	18
3.4. Reticulação	19
3.5. Materiais	19
3.6. Impregnação de medicamentos	20
4. Desenvolvimento das estruturas e impressão 3D	21
4.1. CAD e tipo de ficheiro	21
4.2. Modelo, <i>software</i> e funcionalidades da impressora 3D	22
4.3. Ultimaker Cura e primeiro contacto com a impressão 3D	23
4.4. Menus, controlos e definição de variados parâmetros no Ultimaker Cura	24
4.5. Criação e desenvolvimento da estrutura adotada para o estudo	26
4.6. Impressão do compósito formado por água, açúcar e carbonato de cálcio	28
4.7. Impressão do compósito formado por água e alginato de sódio	30

4.8.	Impressão do compósito formado metilcelulose e alginato de sódio	31
4.9.	Impressão do compósito formado alginato de sódio, quitosano e <i>kaolin</i>	32
4.10.	Impressão do compósito formado por água e hidroxiapatite	34
4.11.	Impressão do compósito formado por água, hidroxiapatite e açúcar/alginato.....	34
4.12.	Impressão do compósito formado por água e álcool polivinílico	35
4.13.	Definição dos parâmetros da nova estrutura	36
4.14.	Compósito com melhor resultado na impressão 3D	37
4.15.	Balanço dos resultados da impressão	37
4.16.	Impregnação de antibiótico nas estruturas impressas	39
5.	Resultados e Discussão	41
5.1.	Testes de citotoxicidade e de dispersão	41
5.2.	Análise morfológica	44
5.2.1.	Análise SEM realizada à estrutura impressa com o compósito 1	45
5.2.2.	Análise SEM realizada à estrutura impressa com o compósito 4.....	46
5.2.3.	Análise SEM realizada à estrutura impressa com o compósito 12.....	46
5.2.4.	Análise SEM realizada à estrutura impressa com o compósito 16.....	47
5.2.5.	Análise SEM + EDS realizada à amostra impressa com o compósito de 12.....	47
5.3.	Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ...	49
5.3.1.	A nálise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 1	50
5.3.2.	A nálise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 4.....	51
5.3.3.	A nálise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 12....	51
5.3.4.	A nálise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 16....	52
5.3.5.	A nálise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 20....	53
6.	Conclusões	55
7.	Perspetivas futuras	57
8.	Referências Bibliográficas	59
9.	Anexos	63

I. Índice de figuras

Figura 1.1 – Diferentes tipos de bioimpressão (adaptado de [6])	5
Figura 1.2 - Tipos de antibióticos e as suas origens (adaptado de [8]).....	11
Figura 3.1 - a) Impressora RepRap, Hephestos Prusa i3 modificada; b) monitor e indicação do software utilizado	18
Figura 3.2 - Estrutura química da sulfanilamida	20
Figura 4.1 - Funções do OpenSCAD para desenho de estruturas	21
Figura 4.2 - Figuras criadas no OpenSCAD e carregadas no Ultimaker Cura	22
Figura 4.3 - a) Monitor com indicação do software utilizado; b) menu principal com indicação da T ambiente; c) menu de comandos; d) menu de movimentação de eixos e extrusor	23
Figura 4.4 - a) Desenho de estrutura exemplo; b) estrutura impressa em PLA	24
Figura 4.5 - Indicação dos menus dedicados às características da impressora e extrusor	24
Figura 4.6 - Menu dedicado às características do extrusor e do bico de impressão.....	25
Figura 4.7 - Aba "monitor" que cotrola a movimentação do extrusor	26
Figura 4.8 - Menus dedicados à estruturação do objeto e a modos de impressão	27
Figura 4.9 - Visualização prévia da impressão de estrutura com <i>infill</i> de linhas.....	27
Figura 4.10 – a) Impressão da pasta de carbonato de cálcio; b) primeira impressão; c) evolução dos resultados	29
Figura 4.11 - Demonstração do processo de desitração das estruturas impressas	29
Figura 4.12 - Registo do trabalho e resultado com a pasta de alginato de sódio	31
Figura 4.13 - Exemplos de tentativas de impressão da pasta com metilcelulose e alginato de sódio	32
Figura 4.14 - Comportamento elástico da estrutura de metilcelulose e alginato de sódio	32
Figura 4.15 - Registo do trabalho e resultado com a pasta de alginato de sódio, <i>kaolin</i> e quitosano.....	33
Figura 4.16 - <i>Scaffold</i> de compósito com 44% de hidroxiapatite e 56% de água	34
Figura 4.17 - a) <i>Scaffold</i> com 48% de hidroxiapatite, 23% de açúcar e 29% água; b) <i>scaffold</i> de compósito com 43% de hidroxiapatite, 1% de alginato de sódio e 56% água	35
Figura 4.18 - Tentativa de impressão de uma estrutura à base de pasta de PVA	35
Figura 4.19 - Nova estrutura criada com <i>infill</i> de grelha e reprodutibilidade automática	36
Figura 4.20 - Tipos de <i>infill pattern</i> : a) linhas; b) grelha.....	36
Figura 4.21 - <i>Scaffold</i> com as melhores propriedades estruturais obtidas.....	37
Figura 4.22 - Catálogo de todas as pastas utilizadas com pequenas amostras	38
Figura 5.1 - Resultados das culturas de bactérias <i>E. coli</i> sujeitas ao antibiótico sulfanilamida impregnado em estruturas de diferentes composições: a) compósito 1; b) compósito 4; c) compósito 12; d) compósito 16; e) compósito 20.....	42
Figura 5.2 - Resultados das culturas de bactérias <i>S. aureus</i> . sujeitas ao antibiótico sulfanilamida impregnado em estruturas de diferentes composições: a) compósito 1; b) compósito 4; c) compósito 12; d) compósito 16; e) compósito 20.....	43
Figura 5.3 - a) Ensaios duplicados para a <i>S. aureus</i> ; b) ensaios duplicados sem antibiótico para a <i>E. coli</i> ; c) ensaios duplicados com antibiótico para a <i>E. coli</i>	44
Figura 5.4 - Análise SEM ao compósito 1: a) 200x; b)3000x	45
Figura 5.5 - Análise SEM ao compósito 4: a) 200x; b)3000x	46
Figura 5.6 - Análise SEM ao compósito 12: a) 200x; b)3000x	46

Figura 5.7 - Análise SEM ao compósito 16: a) 200x; b)3000x	47
Figura 5.8 - Zonas "1" e "2" analisadas em EDS	48
Figura 5.9 - Espectro EDS referente à zona 1 da amostra 12.....	48
Figura 5.10 - Espectro EDS referente à zona 2 da amostra 12.....	49
Figura 5.11 - Espectro FTIR da sulfanilamida pura	49
Figura 5.12 - Espectro FTIR do <i>scaffold</i> de compósito 1	50
Figura 5.13 - Espectro FTIR do <i>scaffold</i> de compósito 4.....	51
Figura 5.14 - Espectro FTIR do <i>scaffold</i> de compósito 12.....	52
Figura 5.15 - Espectro FTIR do <i>scaffold</i> de compósito 16.....	52
Figura 5.16 - Espectro FTIR do <i>scaffold</i> de compósito 20.....	53
Figura 9.1 - Seringa utilizada como reservatório e utensílio de impressão	63

II. Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Setores e aplicações da impressão 3D (adaptado de [4])	3
Tabela 1.2 - Tipos de bioimpressão 3D e as suas características (adaptado de [2])	6
Tabela 4.1 – Estruturas selecionadas e os seus materiais	38
Tabela 9.1 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 1	63
Tabela 9.2 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 4	64
Tabela 9.3 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 12	64
Tabela 9.4 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 16	64
Tabela 9.5 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 20	64
Tabela 9.6 - EDS referente à região 1 da amostra do compósito 16.....	65
Tabela 9.7 - EDS referente à região 2 da amostra do compósito 16.....	65

III. Lista de siglas e abreviaturas

3D – Três dimensões

ALG – Alginato de sódio

CAD – *Computer-Aided Design*

CS – QUI – Quitosano

EDS – *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*

FDA – *Food Drug Administration*

FTIR – *Fourier transform infrared spectroscopy*

HA – Hidroxiapatite

PEG – Polietilenoglicol

PVA – Álcool polivinílico

SEM – *Scanning electron microscope*

UV – Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Motivação e objetivo do estudo

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar novas formas de administração de medicação, recorrendo a técnicas emergentes como a impressão 3D. Através deste método é possível criar estruturas específicas, de acordo com o tipo de finalidade pretendida, além de permitir a manipulação das misturas para impressão, isto é, o controlo de propriedades como a viscosidade e a elasticidade.

A intenção do aprofundamento e da exploração de metodologias e fórmulas a adotar nasceram da curiosidade por um tema multidisciplinar, que combina a automatização de processos (caso da impressão 3D), a área dos biomateriais e a componente biológica. O trabalho em laboratório, que contemplam as técnicas de análise biológica e química aos resultados, revelaram-se importantes para o interesse por este estudo. Além disto, também a livre fabricação de compósitos, possibilitando diversas combinações de substâncias, e o trabalho com vários processos para modificação de propriedades (caso da reticulação) foram igualmente fatores que impulsionaram a vontade em querer participar e realizar esta dissertação.

1.2. Organização e estrutura

Este trabalho começa por abordar a impressão 3D e a bioimpressão, técnica que envolve células, fatores de crescimento e/ou biomateriais, destacando marcos e progressos importantes do seu desenvolvimento. Posteriormente, são descritas algumas técnicas e as suas características principais, sem que seja esquecida uma breve introdução aos antibióticos. De seguida, os métodos, as aplicações e alguns materiais/processos são inseridos de forma a clarificar a linha de produção. E finalmente, os resultados são demonstrados e discutidos, levando assim a uma conclusão do estudo e a perspectivas futuras da área.

1.3. Impressão 3D e bioimpressão

A bioimpressão é uma área em constante evolução que trabalha no aperfeiçoamento de tecidos com determinada organização estrutural. Dedicar-se por isso ao desenvolvimento,

de uma forma automatizada, de produtos biologicamente funcionais com uma certa organização estrutural. Isto é possível recorrendo a moléculas bioativas, células vivas e agregados celulares, como microtecidos, biomateriais ou construções híbridas. Algumas das técnicas convencionais para a produção de tecidos orgânicos como, por exemplo, a lixiviação de partículas, a liofilização, a eletrofiação ou a microengenharia, permitem manipular e trabalhar com uma vasta gama de biomateriais. Porém, normalmente, possuem reprodutibilidade e versatilidade limitadas no que diz respeito à sua síntese [1].

Mais recentemente, surgiu a impressão 3D, posicionando-se, além de um método de fabricação, também como um novo método de biofabricação. Trata-se de uma tecnologia automatizada que permite a criação de estruturas tridimensionais a partir de um modelo digital. Esta técnica traz diversos benefícios, incluindo a alta velocidade de produção, a reprodutibilidade, a economia de matéria-prima, a elevada precisão e controlo sobre a porosidade ou outras especificações do material de impressão, quer durante ou após a mesma [2].

A impressão 3D deu os seus primeiros passos no final da década de 1980, altura em que foi apelidada de prototipagem rápida. Dokama realizou a primeira aplicação desta técnica, embora a descoberta não tenha levado ao seu reconhecimento e estabelecimento no mercado. Já em 1986, Charles (Chuck) Hull patenteou o seu trabalho, baseado na criação de equipamentos de impressão através da técnica de estereolitografia, sendo este o marco oficial que levou ao começo de estudos com a nova tecnologia de impressão 3D [3].

Em 1987, o primeiro sistema tornou-se comercial, enquanto Carl Deckard desenvolvia a impressão assistida por laser e a patenteava em 1989. Empresas começaram a surgir na exploração da impressão 3D, como foram os casos da 3D Systems Corporation, da Stratasys Inc. e da EOS GmbH, empresa que ganhou destaque pela qualidade de produção e pelos protótipos industriais. A década de 1990 ficou marcada pelo crescimento do número de empresas e trabalhos na área da impressão 3D e pela introdução desta tecnologia nas mais diversas áreas, entre elas a produção balística. Já no século XXI a terminologia “manufatura aditiva” foi aceite para designar todos os processos descobertos [3].

No ano de 2007, os modelos de impressora 3D começaram a registar uma queda significativa nos preços de aquisição, tornando-se mais acessíveis ao público geral, isto devido ao desenvolvimento do fenómeno RepRap com código aberto. Denominada por muitos de 4ª Revolução Industrial, a evolução do setor é atualmente apoiada no enorme potencial que a impressão 3D tem vindo a demonstrar [3].

Este método de fabricação é destacado como uma das abordagens mais prometedoras para o futuro nas mais diversas áreas, prevendo avanços na biomédica ao nível da bioimpressão de órgãos e regeneração de tecidos, do desenvolvimento de modelos biológicos para testes mais seguros e também no aperfeiçoamento da medicina

personalizada. Atualmente, esta é já uma realidade e uma afirmação para alguns setores, processos e desenvolvimentos. Evidencia-se em áreas como na indústria fabril, na medicina, na farmacêutica, na indústria alimentar, na moda, entre outras. Na Tabela 1.1 estão descritos alguns exemplos pertencentes a cada um destes domínios.

Tabela 1.1 - Setores e aplicações da impressão 3D (adaptado de [4])

Setor	Aplicações
Indústria	Ferramentas, equipamentos, acabamentos na indústria aeronáutica, protótipos, peças suplentes na indústria automóvel
Medicina	Modelos de cirurgia para estudantes de cirurgia, equipamentos dentários (coroas e pontes), implantes e próteses personalizadas, tecidos vivos para engenharia de tecidos e medicina regenerativa
Farmacêutica	Implantes para libertação de medicamentos, cápsulas e outros métodos de dosagem
Indústria alimentar	Criação 3D de bolos, <i>snacks</i> , doces, pizzas e outras sobremesas
Moda	Joalheria, roupas, calçado e outros acessórios
Doméstico	Pratos, copos, colheres, suportes e outros objetos comuns
Diversos	Construção de protótipos espaciais, fabricação de moléculas e compostos complexos, construção de modelos com arquitetura interna

Também conhecida como fabricação aditiva, tendo em conta que consiste na deposição de material camada a camada, a impressão 3D, inicialmente utilizada apenas nas indústrias automóvel e aeronáutica, viu a sua aplicação expandir-se mais recentemente para a medicina e para o ramo farmacêutico. Isto aconteceu aquando do desenvolvimento de novos e mais apropriados biomateriais biodegradáveis, com boa capacidade de impressão e, principalmente, biocompatíveis. Assim começou a revolucionar não apenas o setor de implantologia e o desenvolvimento de próteses personalizadas na saúde, mas também o transporte e a libertação de fármacos antimicrobianos e antioxidantes [5].

A introdução desta tecnologia na área da biomédica facilitou a produção de equipamentos médicos, ferramentas hospitalares, implantes e até medicamentos, consolidando-se como uma solução essencial para a evolução de estudos como a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa. O marco inicial desta evolução ocorreu em 1984, quando Charles W. Hull utilizou a estereolitografia para criar estruturas poliméricas a três dimensões. Posteriormente, em 1988, Klebe introduziu o conceito de "cytoscribing", que consistia na deposição precisa de células sobre um plano de substrato com recurso à impressão a jato de tinta, a qual era controlada por computador. Contudo, foi apenas no século XXI que a tecnologia passou a ser amplamente adotada para criar estruturas sólidas em 3D a partir de modelos digitais, impulsionando melhorias na velocidade, reprodutibilidade e

diversidade de materiais utilizados, sem comprometer a precisão e o ajuste da porosidade para cada objeto [5].

A bioimpressão começou a revelar-se como uma ferramenta promissora também em testes de medicamentos, destacando-se para estes casos a técnica baseada por extrusão devido à sua capacidade de criar microarquiteturas personalizadas, possibilitando um alto rendimento e um ambiente propício à cocultura celular [6]. Um fator essencial para este tipo de aplicação é o controlo espacial exato da construção, de forma a garantir a integridade estrutural e propriedades como a resolução, a heterogeneidade do material a ser impresso por extrusão e ainda o design pretendido para o objeto. Diferente da impressão 3D convencional, a bioimpressão exige uma seleção de materiais mais rigorosa, sendo altamente sensível quando combinada com compostos celulares e/ou bioativos.

No entanto, a obtenção de propriedades favoráveis a esta técnica recorrendo a biomateriais biocompatíveis posiciona-se como uma limitação para aplicações médicas. Para serem considerados ideais para o ramo da saúde, os materiais precisam de ser biocompatíveis, formar um compósito facilmente imprimível, ter taxas de degradação ajustáveis e apresentar resistência mecânica adequada [5]. A bioimpressão 3D tem grande potencial para a produção de órgãos, tecidos e biosistemas *in vitro*, proporcionando um estudo mais aprofundado, por exemplo, de doenças patogénicas que necessitam de um ambiente altamente realístico, isto é, um meio capaz de mimetizar as condições biológicas, químicas, funcionais e estruturais do organismo e dos tecidos vivos. Por outro lado, oferece ainda alternativas mais precisas para ensaios clínicos, evitando testes em animais e aumentando a previsibilidade dos efeitos dos fármacos *in vivo* [6].

Antes de abordar os tipos de bioimpressão é importante referir que o termo "bioink", também em português apelidado de biotinta, refere-se a um material celular funcional e estruturalmente refinado que é incorporado, idealmente, num hidrogel ou apenas combinado com materiais biocompatíveis e bioativos.

1.4. Técnicas de impressão 3D: características e propriedades

Atualmente, existem já diversas técnicas de bioimpressão 3D (Figura 1.1). As mais conhecidas e adotadas são a bioimpressão por jato de tinta, a bioimpressão por microextrusão, a bioimpressão assistida por laser e a bioimpressão assistida por estereolitografia.

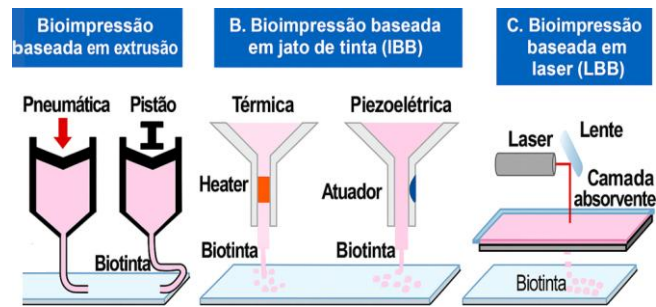


Figura 1.1 – Diferentes tipos de bioimpressão (adaptado de [6])

Entre os tipos de bioimpressão referidos, um dos mais utilizados para a bioimpressão recorre a um jato de tinta. Este diverge o modo de deposição, variando a sua frequência que acontece com formato gota a gota, eletrodinâmico ou contínuo. O modo de mais fácil aplicação é o “gota a gota”, caracterizado pela extrusão da biotinta por um bocal que faz do fluxo simples gotículas devido à instabilidade de Rayleigh-Plateau. Estas gotículas são geradas através de actuadores piezoeléctricos ou térmicos, ou por forças electroestáticas, e permitem uma resolução até 20 micrómetros. Tem ainda um baixo custo e a possível múltipla deposição de vários materiais. Este funcionamento que tem por base o aquecimento para formar uma bolha de vapor que rebenta e faz ultrapassar a tensão superficial do bocal, embora possibilite trabalhar até com células estaminais sem as danificar, só funciona a baixa viscosidade, demora mais tempo e origina fracas características mecânicas [6].

Já a bioimpressão por microextrusão é uma abordagem igualmente adotada e económica que consiste na deposição contínua de um hidrogel através de um micro bocal e que é depositado camada a camada por um sistema mecânico ou pneumático, registando um endurecimento químico ou físico das mesmas. Tem a possibilidade de extrudir vários tipos e quantidades de material celular, bem como de polímeros. Tem uma menor resolução (< 100 μm). A partir desta ideia, Ozbolat desenvolveu uma bioimpressora multi-braços com deposição mais complexa e simultânea de células em menos tempo. Por outro lado, Liu desenvolveu um sistema multimaterial contínuo, envolvendo o uso de sete tipos de biotintas sem troca de bocal [6].

Outro método inovador que surgiu foi a bioimpressão assistida por laser, a qual foi utilizada a primeira vez para depositar materiais inorgânicos. O seu funcionamento é caracterizado pela existência de duas camadas, uma dadora de material e outra de absorção da energia proveniente do laser. Consegue suportar biotintas de elevada viscosidade. No entanto, trata-se de uma técnica cara e mais perigosa para a integridade celular. Num estudo realizado por Koch, onde este incorporou algumas células, 98% das células da pele sobreviveram e 90% das células estaminais mesenquimais sobreviveram, sendo que nenhuma perdeu capacidade de proliferação, nem fragmentação do DNA ou apoptose [6].

A bioimpressão por estereolitografia usa a luz para realizar reticulação fotolítica seletiva das biotintas no processo camada a camada, não sendo necessário aquecer a camada dadora. Tem a particularidade de a cabeça de impressão só se deslocar numa direção. Acarreta as vantagens de ter uma viabilidade celular elevada, de ser uma técnica de rápida impressão e ainda com boa resolução ($< 100 \mu\text{m}$) [6].

É de referir que cada tipo de bioimpressão adotada terá os seus prós e contras que a caracterizam e a diferenciam das restantes consoante o tipo de aplicação. Os principais aspetos e propriedades que definem os vários tipos de bioimpressão 3D estão apresentadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Tipos de bioimpressão 3D e as suas características (adaptado de [2])

Bioimpressão 3D	Viscosidade da pasta (mPa/s)	Densidade celular (cel/mL)	Resolução	Velocidade de impressão	Custo
Jato	3,5-12	Baixa ($<10^6$)	Alta	Rápida	Baixo
Microextrusão	$1-6 \times 10^7$	Sem limite	Moderada	Lenta	Médio
Assistida a laser	1-300	Média ($<10^8$)	Alta	Média	Alto
Estereolitografia	Sem limite	Sem limite	Alta	Alta	Baixo

O equilíbrio entre a fidelidade da forma, tendo em conta a rigidez adquirida, e viabilidade da impressão, pensando na viscosidade, é um grande desafio, dependendo sempre da finalidade da biotinta desenvolvida [6].

Para além destes aspetos, a mistura desenvolvida deve possuir propriedades específicas, como resistência mecânica e robustez adequadas, gelificação e estabilização ajustáveis para facilitar o momento de bioimpressão de estruturas com elevada fidelidade de forma, biocompatibilidade, biodegradabilidade que mimetize o microambiente natural dos tecidos, bem como um potencial de produção em larga escala sem que se confira grande diferença entre amostras. A seleção da biotinta depende da aplicação específica (por exemplo, tecido-alvo) e do tipo de células, bem como da impressora a ser usada ou do tipo de bioimpressão [1].

1.5. Biomateriais e produção de misturas para impressão

Atualmente, os diversos processos de fabricação aditiva continuam a ser desenvolvidos e aprimorados para criar biotintas formadas pelos mais variados biomateriais, compostos bioativos e células. Essas biotintas podem ser naturais, podendo ser baseadas em compostos como o colagénio, a gelatina, o alginato ou o quitosano, ou sintéticas, como o polietilenoglicol (PEG) e o polihidroxietilmetacrilato (PHEMA), ambos capazes de conferir

biocompatibilidade, estruturas com capacidade de extrusão e fotopolimerização, tornando as mesmas propícias à incorporação de componentes celulares.

Na área da biomédica, mais concretamente no setor do estudo de fármacos, da sua aplicação e modo de libertação, um dos tipos de material mais escolhido para o seu transporte são os hidrogéis. Os hidrogéis são formas altamente solicitadas devido às suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade controlável, com elevado teor de água e ligações que podem reter ou facilitar a libertação do fármaco consoante o ambiente envolvente. Como biomateriais característicos adotados para formar a sua composição destacam-se o alginato, a gelatina, o colagénio (sendo este a principal proteína estrutural da matriz extracelular), a fibrina, a goma, o ácido hialorónico, a agarose, o quitosano, a seda, a matriz celular descelularizada, o poli(etilenoglicol) e o plurónico [1].

O alginato é um polissacarídeo aniónico natural. É conhecido por ser biocompatível, pouco citotóxico e por ter um gradual e rápido processo de gelificação (recorrendo a reações com iões cálcio ou bário) que permite uma boa capacidade de impressão. Tem ainda a vantagem de ter um baixo custo e tudo isto o torna num material mais vantajoso para estudos e para aplicações *in vivo*. No entanto, o alginato é um material biologicamente algo inerte, levando-o a ter uma fixação celular limitada [1].

Relativamente à fibrina e ao fibrinogénio, estes são materiais biocompatíveis, biodegradáveis, não imunogénicos e que são já capazes de induzir uma ligação/proliferação celular. São bastante benéficos em ambientes de cicatrização [1].

A goma gelana é outro polissacarídeo aniónico, hidrofílico, com um elevado peso molecular que tem a capacidade de formar um hidrogel (estrutura de suporte) quando sujeito a baixas temperatura e exposto a catiões monovalentes ou divalentes. Foi autorizado como possível aditivo alimentar direto e é habitualmente utilizado na área farmacêutica. Para o processo de bioimpressão a goma gelana é misturada com outros polímeros para uma matriz composta [1].

Outro biomaterial utilizado para hidrogéis é a agarose. Com baixo ponto de fusão, este pode ser combinado com alginato, de forma a controlar eficientemente a viscosidade. Além disso, quando revestido de colagénio pode atribuir um fortalecimento estrutural ao objeto impresso [1].

O quitosano é outro polissacarídeo biocompatível e biodegradável com propriedades antibacterianas e cicatrizantes. É bastante recorrente para auxiliar a construção e a manutenção da matriz de um hidrogel devido às boas propriedades mecânicas, estruturais e de vascularização [1].

Temos ainda a seda, um polímero natural, que se destaca pela sua elevada elasticidade, por uma lenta taxa de degradação, baixa imunogenicidade e boa biocompatibilidade [1].

Um exemplo de um polímero sintético favorável para a impressão e manutenção de estruturas 3D é o PEG. Não é citotóxico, não tem imunogenicidade e pode ser reticulado por luz. No entanto, é um biomaterial inerte, tal como o alginato. Para combater este fator, o PEG pode ser combinado com hidroxiapatite e gelatina, o que leva a construções mais rígidas. Se combinado ao alginato, a mistura precisa de sofrer reticulação química e iônica [1].

O plurônico, por sua vez, trata-se de um biomaterial sobretudo para uso sacrificial na bioimpressão, visto possuir boas propriedades mecânicas e de gelificação em resposta à temperatura. A adição de ácido hialurônico metacrilato (HAMA) aumenta a resistência mecânica da construção e a policaprolactona (PCL) a rigidez das construções [1].

As próprias misturas para impressão podem ser classificadas conforme o seu propósito de utilização. Temos as seguintes categorias:

- biotinta de suporte – auxiliam na preservação e permitem a proliferação e multiplicação celular;
- biotinta fugitiva – são primeiramente integradas na estrutura e quando removidas posteriormente permitem a formação de canais;
- biotinta estrutural – desenvolvidas para oferecer estabilidade mecânica ao restante da composição sem que tenham mais qualquer outro propósito;
- biotinta funcional (influenciando o comportamento celular).

Todas elas precisam de respeitar requisitos como a citocompatibilidade, a bioatividade e a manutenção estrutural após a impressão. O uso de hidrogéis termorresponsivos ou fotocuráveis pode ser uma solução para melhorar a estrutura dos *scaffolds*, permitindo uma solidificação rápida através de estímulos térmicos ou luz UV [6].

Os biomateriais são avaliados segundo propriedades tais como a sua capacidade de impressão, biodegradabilidade e o seu comportamento mecânico. Entre os mais promissores, a hidroxiapatite tem-se destacado na engenharia de tecidos, visto que demonstra possuir um bom nível de bioatividade, além de ser biocompatível, osteocondutível, inócua, de lenta degradação e de baixo custo [2,7]. A utilização da hidroxiapatite em pó confere um melhor reforço mecânico e uma menor bioatividade, características favoráveis para o transporte e libertação de substâncias. Por outro lado, as nanopartículas de hidroxiapatite têm uma maior bioatividade e capacidade de agregação, indicadas para processos de regeneração.

A hidroxiapatite tem a vantagem de poder ser obtida através fontes naturais, como cascas de ovos, espinhas de peixe e conchas [8]. Os *scaffolds* de hidroxiapatite possuem aplicações em reparações e substituições ósseas, devido à sua composição química semelhante à do mineral ósseo, bem como na administração de medicamentos [7]. Para a libertação controlada de fármacos, a hidroxiapatite pode ser combinada a biopolímeros, como o alginato, garantindo uma distribuição sustentada dos princípios ativos [2]. No entanto, a sua fragilidade e as fracas propriedades mecânicas limitam a sua aplicação em larga escala,

direcionando-a principalmente para o uso em pós e revestimentos sobre substratos metálicos [7]. Numa alternativa, a hidroxiapatite tem a necessidade de ser incorporada num compósito com polímeros aglutinantes (ex: maltodextrina, ácido polivinílico) para tornar viável a sua impressão. Estes compósitos, produzíveis por métodos como a biomimética, a liofilização ou a automontagem, são usados para melhorar as propriedades mecânicas do objeto a adquirir [2].

Para superar estas limitações, a combinação da hidroxiapatite com o quitosano (CS) revelou-se uma solução promissora ao criar um compósito que alia as vantagens de ambos os materiais. Esta matriz composta apresenta uma maior resistência mecânica, mantendo simultaneamente uma elevada bioatividade e capacidade biomimética. O quitosano, derivado da desacetilação da quitina, torna-se solúvel em meio ácido quando atinge cerca de 50% de desacetilação. Este biopolímero apresenta propriedades biológicas notáveis, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, bioatividade e atividade antimicrobiana. Além disso, a presença de grupos hidroxilo e amina na sua estrutura química confere-lhe alta reatividade, influenciando a sua solubilidade e funcionalidade. Estes *scaffolds* biocompósitos podem assim atuar como sistemas de libertação de fármacos, permitindo a incorporação controlada de antibióticos, anticancerígenos, anti-inflamatórios e fatores de crescimento. No entanto, a sua fraca resistência mecânica e baixa solubilidade em soluções neutras ou alcalinas limitam a sua utilização de forma isolada [7].

Portanto, assumir uma libertação de fármacos a partir de estruturas baseadas em hidroxiapatite mostra um perfil inicial de libertação rápida nas primeiras 24 horas. No entanto, a adição de quitosano permite um controlo mais eficaz da libertação, retardando a difusão do fármaco devido à sua elevada viscosidade e capacidade de degradação gradual. Assim, os *scaffolds* HA-CS representam uma solução altamente eficiente para a administração localizada de medicamentos, evitando efeitos secundários sistémicos e melhorando a eficácia terapêutica [7].

Estudos já realizados indicam que, apesar de tudo, a incorporação de nanopartículas de substâncias metálicas nestes compósitos, seria capaz de levar à aquisição de algumas vantagens, entre as quais, o crescimento de propriedades antimicrobianas (para casos com nanopartículas de liga cobre/zinco), antibacterianas (para situações de trabalho com iões prata), anti-infecciosas/tumorais (ao recorrer a iões bismuto) e até de inchaço (nanopartículas de liga cobre/zinco), facilitando a infiltração [7]. Outrora, possivelmente provocaria um problema ao nível da biocompatibilidade e contaminação a longo prazo.

1.6.Futuro da bioimpressão 3D

Embora a bioimpressão 3D ainda esteja a dar pequenos passos de desenvolvimento na área da saúde, a sua versatilidade continua a dar mais bases e suportes para tornar as aplicações na engenharia de tecidos mais promissoras. Existem inúmeros esforços para o avanço da tecnologia de bioimpressão e para o desenvolvimento de biotintas apropriadas que atendam à maioria dos requisitos de bioimpressão no que diz respeito às propriedades mecânicas, reológicas e biológicas. Juntando estes três tipos, há claramente limitações e questões a evoluir [1].

A bioimpressão 4D, expressão atribuída à impressão 3D de biomateriais carregados com células que confere à estrutura impressa uma “bio-sensibilidade” a estímulos externos, surge como um avanço ao ser capaz de promover a cura, a cicatrização e a regeneração celular. Apesar dos avanços, a obtenção de uma estrutura com melhores propriedades estruturais ainda representa desafios para a expansão da bioimpressão [5].

1.7.Antibióticos e a sua incorporação nas estruturas impressas

A impregnação de antibióticos é uma área em constante desenvolvimento, quer ao nível do próprio método de incorporação e forma de transporte da substância, como também relativamente ao processo da sua libertação no meio. A sua evolução tem acompanhado a descoberta e/ou síntese desses mesmos antibióticos ao longo dos anos.

O primeiro antibiótico foi desenvolvido e testado em 1910. A evolução destas substâncias, capazes de matar ou inibir o crescimento de bactérias, aumentaram a esperança média de vida em cerca de 23 anos durante o último século. A penicilina destacou-se como sendo o primeiro grande sucesso, seguindo-se um pico no desenvolvimento de antibióticos até à década de 1950. Desde então que a resistência antimicrobiana tem marcado um declínio gradual na descoberta de novos compostos para combater as infeções [9].

Existem várias classes para caracterizar a origem de cada tipo de antibiótico, algumas delas apresentadas na Figura 1.2: os compostos provenientes de actinomicetos, os compostos provenientes de outras bactérias, os compostos provenientes de fungos e os compostos sintéticos. Destacando os antibióticos sintéticos, aos quais se recorreu para realizar este estudo, pode-se referir que existem diversos tipos, como as sulfonamidas, os salicilatos, as piridinamidas, entre outros [9].

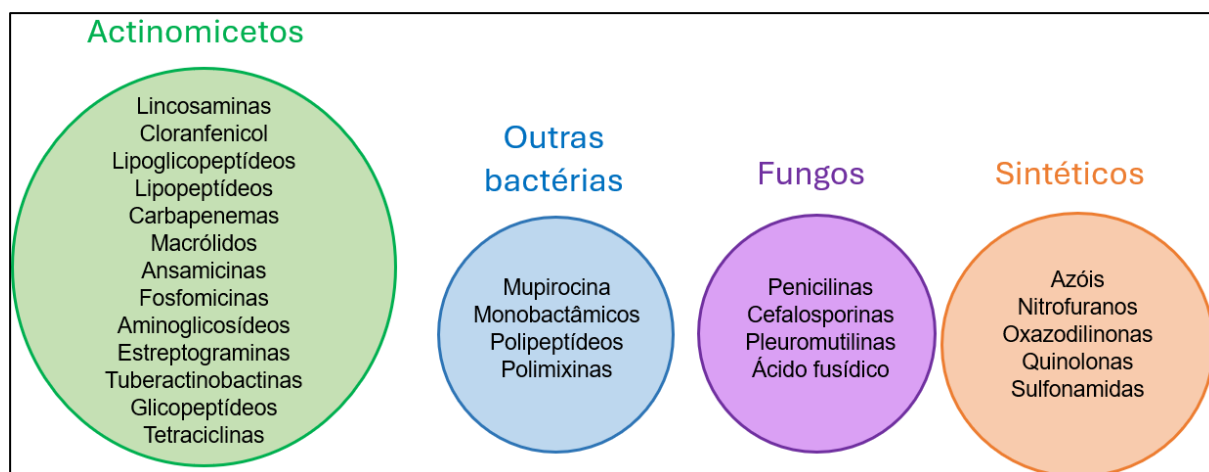


Figura 1.2 - Tipos de antibióticos e as suas origens (adaptado de [8])

No caso das sulfonamidas, estas foram descobertas em 1932, introduzidas clinicamente em 1936 e têm como principal alvo a inibição da diidropteroato sintetase. Trata-se dos primeiros antimicrobianos de amplo espectro verdadeiramente eficazes, posteriormente alternados com a penicilina, a partir da qual alguns derivados semissintéticos foram criados para combater a resistência aos antibióticos [9].

A antibiose foi o nome atribuído à secreção de material por parte dos micróbios para matar outras bactérias. Selman Waksman definiu um antibiótico como sendo um composto feito por um micróbio capaz de destruir outros micróbios. O trabalho por ela desenvolvido permitiu a era dourada na descoberta de antibióticos (1940 a 1960), cuja eficácia entrou em declínio devido ao aumento da resistência ao medicamento [9].

A atuação destes fármacos pode ser feita de diversas formas, sendo as mais comuns realizada por via oral ou por contacto, se a infeção for localizada.

Relativamente aos processos de libertação conhecidos, a desintegração tem a capacidade de entregar toda a quantidade de fármaco transportado, enquanto a difusão e a dissolução apenas vão contribuindo com as quantidades que se encontram mais à superfície e relativo contacto com o meio envolvente [10].

De referir que o primeiro relato de um teste de desintegração foi publicado na farmacopeia suíça, em 1934. Este termo refere-se à quebra mecânica de um comprimido em pequenos grânulos. Caso o fármaco esteja presente em forma de pó, a deformação elástica e as ligações entre as partículas são mais influentes. Após a desintegração dá-se a fragmentação, processo que refere a divisão dos grânulos em partículas ainda menores. A porosidade da estrutura é um fator que interfere na facilidade com que ocorrem estes fenómenos, levando ao ambiente favorável para a sua desintegração total. O fluido envolvente pode também possuir a capacidade de ir dissolvendo as partículas de medicamento que estejam alojadas nas paredes dos poros. Isto acontece através da absorção, isto é, da

penetração do fluido fisiológico que compromete a integridade estrutural. O grau de facilidade com que esta situação acontece, define a propensão de cada matriz para cada tipo de aplicação e finalidade pretendida [10].

Os comprimidos ou cápsulas não são apenas constituídos pelo fármaco, mas também por excipientes e matrizes que desempenham o papel transportador, de adequação da dose, de processador e/ou de influenciador da libertação. No momento da interação com os fluidos fisiológicos, mecanismos como a desintegração ou a dissolução desempenham fatores determinantes para a eficiência terapêutica, por exemplo, ao nível da velocidade da entrega do medicamento. Métodos *in situ* e o estudo através de modelos matemáticos são cada vez mais capazes de simular e prever o comportamento e o impacto das libertações. Enquanto para analgésicos há o desejo por rápido início de ação, o uso de matrizes poliméricas confere à libertação um período no tempo de efeito mais alargado, vantajoso para antibióticos e casos de infeção, por exemplo [10].

Nos casos em que materiais poliméricos são utilizados para a constituição da matriz, consegue-se uma taxa de libertação mais lenta devido ao inchaço e ao revestimento que atuam como barreira [10].

O papel da microestrutura da matriz porosa no mecanismo de desintegração é claro, tal como a variação de parâmetros de organização e de materiais utilizados podem resultar em mudanças significativas [10].

2. A evolução da impressão 3D na área da saúde, da bioimpressão e da dopagem das estruturas

A impressão 3D tem-se revelado uma tecnologia promissora na área biomédica, permitindo a fabricação de *scaffolds* personalizados para regeneração de tecidos e administração controlada de fármacos, ajustando a taxa de dissolução e otimizando a dosagem dos medicamentos. Estes avanços devem-se ao desenvolvimento de novos biomateriais e métodos de fabricação, que possibilitam a criação de estruturas porosas, bioativas e com propriedades mecânicas ajustáveis [2].

Em 2015, Goyanes *et al.* exploraram a impressão 3D no âmbito da produção de comprimidos personalizados, variando a geometria e as camadas do medicamento para ajustar a sua taxa de dissolução. Esta abordagem demonstra a capacidade da impressão 3D para desenvolver sistemas precisos e adaptáveis à necessidade do paciente [7].

Na área da bioimpressão de tecidos moles, em 2016, Rimann *et al.* trabalharam numa *bioink* à base de PEG e fibroblastos humanos primários. Conseguiram demonstrar a viabilidade e proliferação celular até sete semanas. As estruturas impressas evidenciaram estabilidade celular e biologicamente funcional. O PEG destacou-se pela sua elevada reprodutibilidade e manipulação química, contrastando com os materiais naturais que, apesar da maior bioatividade, são estruturalmente e biologicamente mais exigentes. Esta descoberta abriu o caminho para mais soluções para os tecidos moles funcionais [11].

Passados dois anos, Fina *et al.* publicaram o desenvolvimento de *scaffolds* poliméricos impressos em 3D para a libertação controlada de ibuprofeno, utilizando ácido polilático (PLA). A variação da porosidade permitiu modular a taxa de libertação do fármaco, demonstrando o potencial da impressão 3D para personalizar tratamentos farmacológicos [7].

Wang *et al.*, em 2018, criaram um sistema de libertação sustentada de antibióticos, incorporando gentamicina em *scaffolds* de hidrogel e biovidro. Os resultados demonstraram que a libertação controlada do antibiótico ajudou a prevenir infeções pós-cirúrgicas em defeitos ósseos, representando um avanço significativo na medicina regenerativa. Já Ardelean desenvolveu *scaffolds* 3D compostos por hidroxiapatite e colagénio, demonstrando boa resposta celular. A incorporação do colagénio confere uma melhor adesão e proliferação das células, uma vez que se trata de um componente da matriz óssea [7].

Já Huang *et al.* prepararam nanocompostos de HA e fibroína de seda através de precipitação *in situ*, obtendo *scaffolds* com porosidade de 70%, poros interconectados (~400 µm) e resistência à compressão superior a 6 MPa. Estes fatores são fundamentais para a vascularização e integração celular. Além disso, os *scaffolds* apresentaram atividade de

biomineralização *in vitro* e estabilidade de pH, favorecendo a fixação e penetração de células [12].

Ainda nesse ano, Koski *et al.* utilizaram fabricação livre de sólidos baseada em pasta de amido gelatinizado de origem natural e combinada com hidroxiapatite de forma a obter alta resistência mecânica e boas propriedades biológicas sem recorrer a processos possivelmente tóxicos e/ou pouco sustentáveis face à viabilidade biológica, como a reticulação ou outras técnicas de pós-processamento. O amido contribuiu para propriedades mecânicas semelhantes às do osso esponjoso, além de melhorar a fixação e proliferação celular devido à sua interação com o PCL, outro constituinte da pasta produzida [13].

Três anos depois, em 2021, Melocchi *et al.* imprimiram formas personalizadas de comprimidos ao controlar digitalmente os materiais, a geometria e a arquitetura interna das estruturas impressas. Demonstrou-se que a tecnologia tem potencial na produção de sistemas com liberação imediata ou prolongada, utilizando polímeros sensíveis ao pH, como o Eudragit L100 e S100, que permitem alcançar perfis de liberação retardada ou pulsátil [14].

No âmbito do desenvolvimento de *scaffolds* bioativos, Lei Nie e Yaling Deng desenvolveram, na última década, *scaffolds* baseados em fosfato de cálcio bifásico e alginato dopado com prata, utilizando um método de emulsões duplas. Os resultados indicaram que as estruturas produzidas apresentavam distribuição homogênea das nanopartículas dos compostos em causa, conferindo excelente biocompatibilidade e atividade antibacteriana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa). Além disto, os *scaffolds* foram capazes de incorporar e libertar doxorubicina de forma controlada, alcançando uma liberação cumulativa de 73,3% após 72 horas em PBS, evidenciando o potencial desta abordagem na administração de fármacos [15].

Os estudos analisados demonstram que a impressão 3D tem um impacto significativo no desenvolvimento de *scaffolds* para regeneração de tecidos e administração de fármacos. No entanto, ainda existem desafios a serem superados, tais como:

- melhoria da vascularização dos *scaffolds* para garantir a sobrevivência celular;
- otimização das propriedades mecânicas para aplicações clínicas mais exigentes;
- integração celular e funcionalidade a longo prazo;
- escalabilidade e regulamentação para a transição dessas tecnologias para o uso clínico.

A contínua evolução das técnicas de impressão 3D, combinada com o desenvolvimento de novos biomateriais, poderá permitir avanços significativos na medicina regenerativa e na terapêutica personalizada.

Além disso, vários recursos de *scaffolds* baseados em hidroxiapatite, incluindo a capacidade de impressão 3D, biodegradação, resistência mecânica apropriada e

biocompatibilidade, facilitarão o uso da bioimpressão 3D para desenvolver futuros projetos exigentes sob demanda e que terão a vantagem de serem alcançados a preços mais reduzidos [2].

3. Metodologia

No seguimento dos capítulos anteriores, este abordará as técnicas e o material utilizado para o desenvolvimento do estudo em causa. Primeiramente, será apresentada uma breve descrição dos passos para desenhar as estruturas de forma computacional, algumas particularidades da impressora e do tipo de impressão adotada. Seguir-se-á uma lista dos materiais estudados experimentalmente para formar os diferentes compósitos. Haverá ainda uma abordagem às técnicas de tratamento pós-impressão, bem como aos procedimentos executados para a impregnação de medicamentos na estrutura. Por fim, os métodos de caracterização e avaliação de resultados serão igualmente enumerados e explicitados.

3.1.Primeira abordagem à impressão 3D

A técnica de impressão 3D é composta por várias fases. A primeira destina-se à criação de modelos *Computer-Aided Design* (CAD), obtendo estruturas sólidas e visíveis em 3D. Nesse mesmo processo, o foco está nos parâmetros da construção do objeto, momento onde o desenho da peça é posto em prática ao analisar um arquivo de script, “renderizando” o respetivo modelo e tornando-o digitalmente visível em 3D. Para a realização destes tópicos recorreu-se ao software OpenSCAD.

Após a criação do modelo CAD, este deve ser exportado para um software, onde são abordados parâmetros de impressão, quer relativamente ao extrusor, quer ao nível do material, antes de proceder à mesma. O software utilizado para estas finalidades foi o UltiMaker Cura. A velocidade e qualidade podem ainda ser reguladas consoante a estrutura pretendida e o tipo de material em causa.

3.2.Tipo de impressão 3D implementado

Para desenvolver os *scaffolds*, neste estudo foi adotada a técnica de impressão por extrusão. O modo de atuação em causa acontece por compressão por parte de um pistão, mais especificamente, exercendo uma força sobre o material que se encontra dentro da seringa (Figura 9.1 em Anexo) dedicada ao armazenamento do material.

A impressão por extrusão é um sistema relativamente fácil de configurar e baseada na deposição contínua de camada a camada do material, o qual é extrudido do compartimento por via de uma força mecânica. Tem por base o uso de polímeros para conferir uma boa integridade estrutural após a impressão. Esta técnica permite deposições altamente precisas de material e uma velocidade considerada nesse processo, além de ser capaz de lidar com

diferentes viscosidades. Usam-se para este tipo de impressão e aplicação uma vasta gama de substâncias, desde polímeros naturais (colagénio, gelatina, alginato, ácido hialurónico) a polímeros sintéticos (PVA, PEG). Geralmente a biotinta passa por uma fase de reticulação química ou de UV para melhorar as propriedades físicas da construção após a impressão [4,16].

Trata-se de um tipo de impressão de baixo custo, com simples necessidade de supervisão e com fácil realização de manutenção. No entanto, sofre entupimento do bico com maior regularidade devido ao facto de estar em constante contacto com o ar e de não haver um mecanismo que proporcione a desobstrução.

De acordo com dados apresentados na Tabela 1.2, o trabalho por ela realizado estará na faixa de viscosidade de 1 a 6×10^7 mPa e com resolução entre 100 e 200 μm . Tem menor resolução que outras técnicas, já abordadas no tópico da introdução, e a biotinta nem sempre tem os requisitos mecânicos mais benéficos para a aplicação pretendida [17].

3.3.Características da impressora 3D

A impressora utilizada para realizar os estudos (Figura 3.1a) foi, quase na sua totalidade, obtida através da combinação de componentes baseados num polímero biodegradável e renovável, o PLA, também eles impressos antes deste estudo, recorrendo a uma impressora do mesmo estilo. Todo o processo foi garantido por pessoal competente. Isto permite adquirir um método de baixo custo de produção e manutenção. O software de apoio na impressora é gratuito e denominado de Marlin 2.1.2.1 (Figura 3.1b). Dispõe de um menu onde é possível mover os eixos e o extrusor, controlar a velocidade de impressão, entre outras funcionalidades que permite uma interação intuitiva.

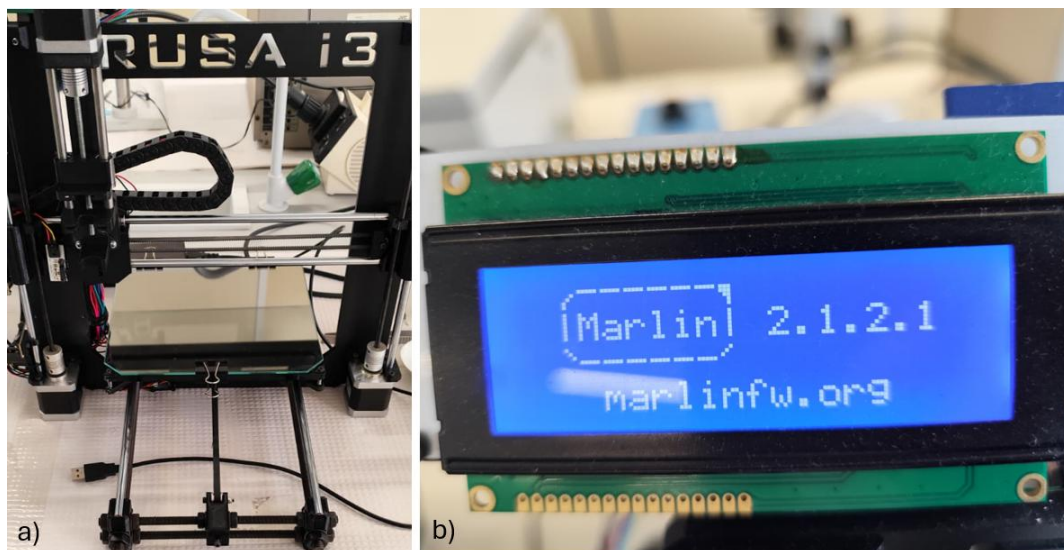


Figura 3.1 - a) Impressora RepRap, Hephestos Prusa i3 modificada; b) monitor e indicação do software utilizado

3.4. Reticulação

O processo de reticulação (*crosslinking*) pode ser realizado de forma física ou química, criando uma rede tridimensional.

A reticulação física consiste na formação de ligações fracas e reversíveis entre materiais flexíveis, isto é, através de ligações não covalentes entre polímeros ou redes moleculares com cadeias móveis, baixa rigidez e baixo módulo de Young. Muitos são considerados macromoléculas devido às ligações em cadeia [16].

Em reticulações químicas, as propriedades da estrutura podem ser modificadas, ao nível das ligações, quando expostas a alguns tipos de soluções. Assim, é de igual forma possível reduzir a solubilidade e tornar as estruturas insolúveis em água. São criadas ligações covalentes e os materiais tornam-se mais rígidos.

Neste estudo, para qualquer situação de reticulação, esta foi realizada somente após o término da impressão. Em casos onde esta ocorreu dentro de uma placa de Petri, optou-se por enchê-la por completo, submergindo a peça em solução de cloreto de cálcio. Se esta tiver sido feita numa placa de vidro plana, o mesmo processo foi garantido libertando pequenos gotas sobre a estrutura impressa.

3.5. Materiais

Para fabricar o compósito ideal para impressão foi necessário realizar uma primeira seleção de materiais. Uma das principais exigências é que estes fossem biocompatíveis e citocompatíveis. Assim, selecionaram-se matérias como a hidroxiapatite, o alginato de sódio, o quitosano, o *kaolin*, a metilcelulose e a sacarose.

A hidroxiapatite utilizada em muitos dos exemplos é uma das formas que está presente no tecido ósseo, concretamente designada por fosfato de cálcio tribásico $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, com um peso molecular de $1000,67\text{gmol}^{-1}$. Este material tem na sua composição 34-40% de cálcio e foi adquirido à *thermo scientific*.

Relativamente a outro dos compostos principais, o alginato de sódio é um polissacarídeo natural proveniente de algas castanhas e é caracterizado por ser um ótimo gelificante e uma substância estabilizadora. Adquirido à *Fisher Scientific*.

O quitosano, polímero orgânico, utilizado para algumas matrizes foi, a par da hidroxiapatite, adquirida à *thermo scientific*.

Por um lado, a metilcelulose testada para averiguar as propriedades, principalmente mecânicas, que esta pode conferir às estruturas foi obtido através da *Metylan*. Por outro lado, o vulgar açúcar branco (sacarose), de baixo custo, é proveniente do *DIA Portugal*.

3.6. Impregnação de medicamentos

A introdução de um composto numa estrutura pode ser feita de vastas formas. A mais eficaz seria misturá-lo com a pasta antes da impressão. No entanto, esta técnica poderia provocar um espessamento da pasta comprometendo a capacidade de impressão. Outra forma, e a realizada neste estudo, é executada por submersão numa solução concentrada e por conseqüente absorção.

O antibiótico que foi designado para o estudo da absorção por parte das estruturas impressas foi a sulfanilamida (Figura 3.2), um antibiótico que pertence à família das sulfonamidas. Foi o primeiro antibacteriano de origem sintética, surgiu no ano de 1908 e foi reconhecida nos anos 30. Trata-se de uma substância antibacteriana e que tem na sua composição um grupo anilina e um grupo sulfonamida. Destaca-se pela capacidade de inibir reações enzimáticas onde esteja presente o ácido para-aminobenzóico, necessário para a produção de ácido fólico e dihidrofólico, ambos ligados à construção do DNA bacteriano. Esta ação dá-se numa situação de competição devido à semelhança da estrutura [18].

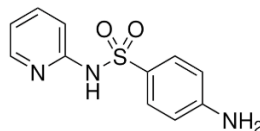


Figura 3.2 - Estrutura química da sulfanilamida

Neste estudo, o procedimento para a impregnação envolveu a realização de uma diluição da sulfanilamida em etanol, obtendo uma concentração de 2,5% (m/v). Diversas estruturas de diferentes compósitos foram submersas na solução com o objetivo de incorporar, pelo método de absorção, o antibiótico nela presente. O solvente é, posteriormente, removido por evaporação.

4. Desenvolvimento das estruturas e impressão 3D

4.1.CAD e tipo de ficheiro

Para desenvolver os projetos de CAD foi tido como base o programa OpenSCAD, um software livre e disponível para vários sistemas operativos como o Linux/UNIX, MS Windows e MAC OS X.

O OpenSCAD destina-se à criação de modelos 3D sólidos desenhados computacionalmente, focando-se essencialmente nos aspetos CAD após efetuar uma leitura de um arquivo de script e de seguida uma renderização do respetivo modelo. O software apresenta ao utilizador uma janela onde apresenta, num espaço tridimensional, a estrutura criada à medida que as funções são chamadas e relacionadas entre elas.

O OpenSCAD permite adotar dois tipos de modelagem: por geometria sólida construtiva (CSG) ou por extrusão de contornos 2D. É utilizado o Qt para a interface do usuário, o CGAL para avaliar o CSG, o OpenCSG e o Open GL para o visualizar, e ainda o boost, o eigen e o glew.

Para proceder à criação de estruturas virtuais, esta é possível implementando e combinando diversas funções, todas elas indicadas na Figura 4.1.

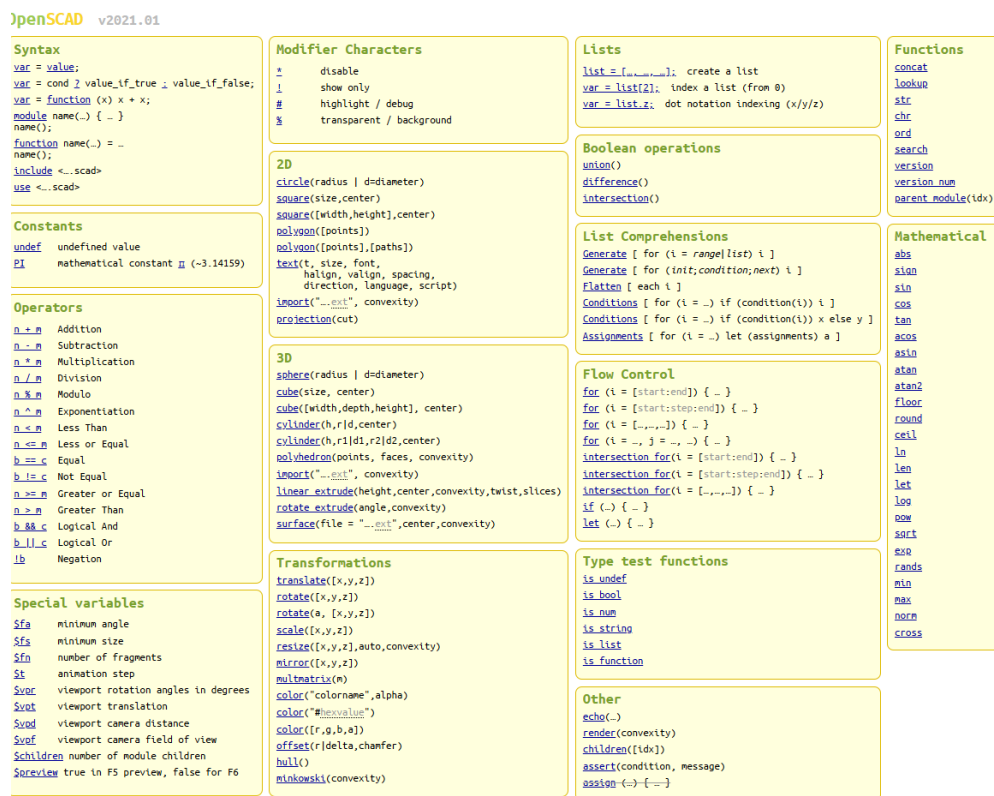


Figura 4.1 - Funções do OpenSCAD para desenho de estruturas

Após a criação do modelo no OpenSCAD e executada a respetiva renderização, procede-se à exportação e conversão do respetivo ficheiro para o formato “.stl”, de forma a que este possa ser executado pelo programa dedicado à futura impressão dos objetos pelo método *slice* (Figura 4.2), o UltiMaker Cura.

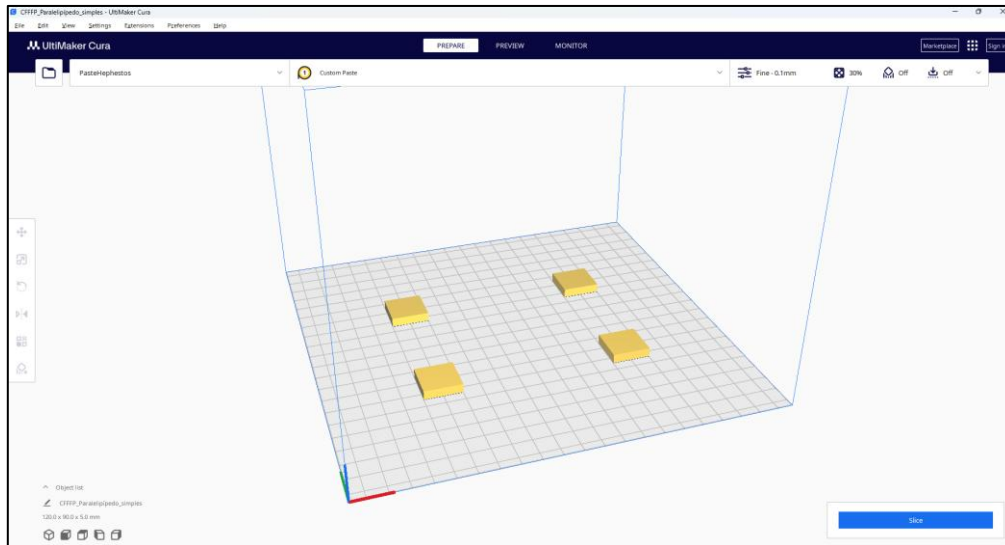


Figura 4.2 - Figuras criadas no OpenSCAD e carregadas no Ultimaker Cura

4.2. Modelo, software e funcionalidades da impressora 3D

Como já referido anteriormente, a impressora utilizada para a realização deste trabalho foi em grande parte desenvolvida a partir da impressão 3D. Esta particularidade atribui um menor custo de adesão e de manutenção a esta técnica que está em constante desenvolvimento. O tipo de material adotado para criar a impressora, o PLA, faz desta um equipamento relativamente resistente e, ao mesmo tempo, suficientemente leve para permitir o seu fácil transporte.

O software instalado é o Marlin, uma ferramenta gratuita e intuitiva. A navegação é auxiliada por um botão rotativo, através da qual podemos proceder a uma calibração da posição da base de impressão, à movimentação controlada dos eixos para o extrusor, bem como à variação da velocidade, entre outros parâmetros, de impressão. Todas estas funcionalidades quando combinadas com o Ultimaker Cura oferecem uma experiência detalhada e personalizada.



Figura 4.3 - a) Monitor com indicação do software utilizado; b) menu principal com indicação da T ambiente; c) menu de comandos; d) menu de movimentação de eixos e extrusor

Na Figura 4.3a temos a iniciação do software assim que é ligada a impressora. Na Figura 4.3b está representado o status atual, nomeadamente, a temperatura ambiente, a posição do extrusor e a velocidade da movimentação do bico de impressão. A Figura 4.3c mostra o menu que é disponibilizado ao utilizador de forma a que haja uma navegação facilitada pelas ferramentas e funcionalidades oferecidas. Por fim na Figura 4.3d está amostrado o parâmetro mais abordado, o controlo do movimento e da posição, dada a importância da precisão na impressão 3D.

4.3.Ultimaker Cura e primeiro contacto com a impressão 3D

Posteriormente, através do UltiMaker Cura é possível proceder à fase de impressão, submetendo antecipadamente as configurações referentes à impressora utilizada, bem como os parâmetros sobre o extrusor e o material de impressão. O Cura permite ainda controlar parâmetros de velocidade e qualidade.

Numa primeira abordagem, foi desenhada uma estrutura para demonstrar o alto nível de complexidade com que é possível trabalhar a partir de um software como o OpenSCAD e finalizada com recurso ao Ultimaker Cura. O objeto demonstrado na Figura 4.4a foi obtido através de comandos como a definição do tamanho dos hexágonos, o posicionamento e a variação angular para cada braço radial, bem como o número de braços e o número de

hexágonos para cada um deles. Foi ainda definida a espessura das paredes. Na Figura 4.4b está um registo fotográfico após a impressão. Este primeiro exemplar, somente para testar e visualizar o mecanismo de impressão, foi criado com um fio de PLA que é exposto a altas temperaturas ao passar no extrusor e depois sujeito ao arrefecimento já na placa que serve de base à impressão.

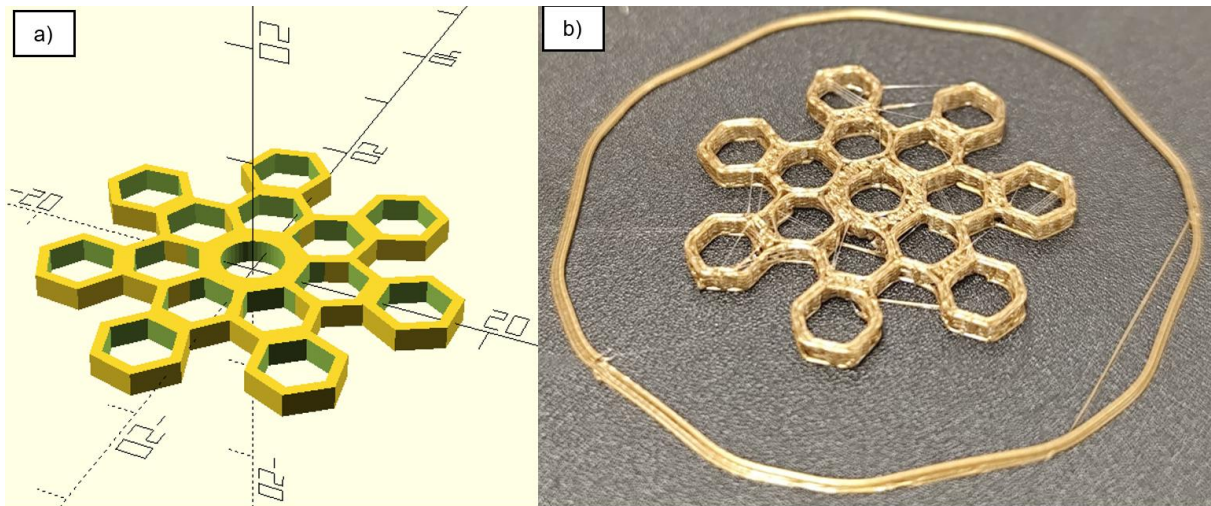


Figura 4.4 - a) Desenho de estrutura exemplo; b) estrutura impressa em PLA

4.4. Menus, controlos e definição de variados parâmetros no Ultimaker Cura

Numa segunda perspetiva, aquela já dedicada ao futuro do estudo, foi necessário adaptar alguns parâmetros devido à alteração do foco da impressão. Em dois pequenos menus acessíveis na parte superior esquerda da janela temos os locais para informar o software sobre as características da impressora e sobre o tipo de material destinado para a impressão. Na Figura 4.5, as posições destes estão indicadas pelas setas amarelas.

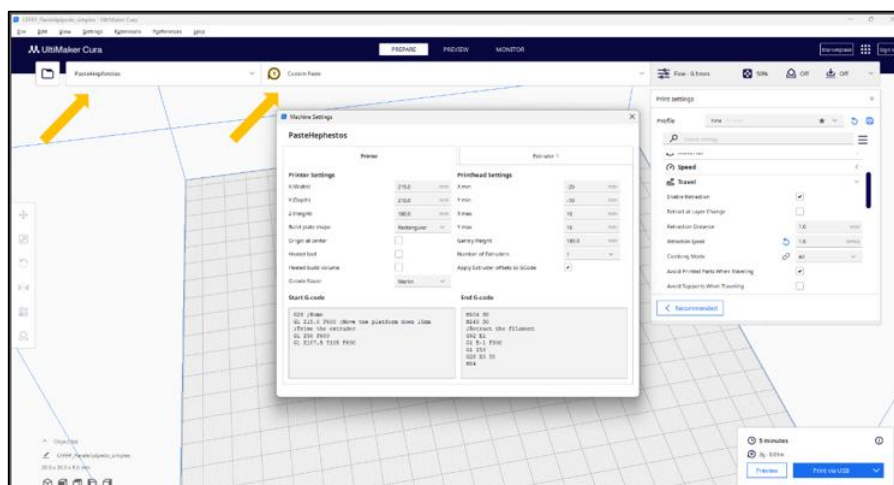


Figura 4.5 - Indicação dos menus dedicados às características da impressora e extrusor

Relativamente ao menu que reúne as indicações sobre os dados do equipamento (Figura 4.5), são necessários dados como as dimensões do espaço tridimensional para a impressão, o número de extrusores utilizados, as posições extremas na movimentação do bico, bem como o delinear do percurso pretendido para a ponta de impressão, quer antes quer após a mesma. Além disto, informações à cerca do extrusor também são igualmente pertinentes (Figura 4.6). Aqui, detalhes como o tamanho do *nozzle*, isto é, o diâmetro da ponta, e o diâmetro da seringa utilizada como depósito para a pasta são os mínimos para que a impressora esteja calibrada para uma deposição calibrada de material.

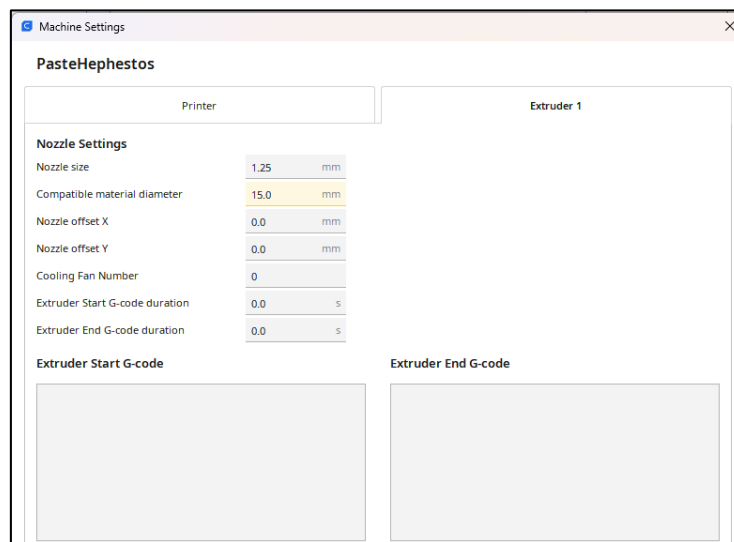


Figura 4.6 - Menu dedicado às características do extrusor e do bico de impressão

Para proceder à impressão dos primeiros exemplares foi ainda criado um tipo de material, exigido pelo software, onde foram fornecidas indicações sobre a distância e a velocidade de retração, a densidade e o diâmetro da seringa de depósito. Trata-se de uma simples customização, sem grande impacto para primeiras análises. Estes dados foram inicialmente preparados para a primeira pasta que tinha na sua composição carbonato de cálcio (70%), açúcar (15%) e água (15%). Foram então definidos os seguintes valores:

- densidade: 1.24 g/cm³
- diâmetro: 15 mm
- distância de retração: 1 mm
- velocidade de retração: 10 mm/s

Estes valores ajudam a controlar os momentos em que a ponta tem de se deslocar sem que haja deposição de material.

Na aba "monitor" temos a possibilidade de interromper e controlar o deslocamento do extrusor de forma computacional (ver centro de comandos na Figura 4.7. Esta funcionalidade revela-se útil para casos de acerto da altura da base de impressão. Além disto, assim é

possível evitar, por exemplo, situações que possam comprometer a integridade de material de suporte (ex: placas de petri), ou até mesmo o próprio trabalho, em casos de necessidade de aborto de impressão.

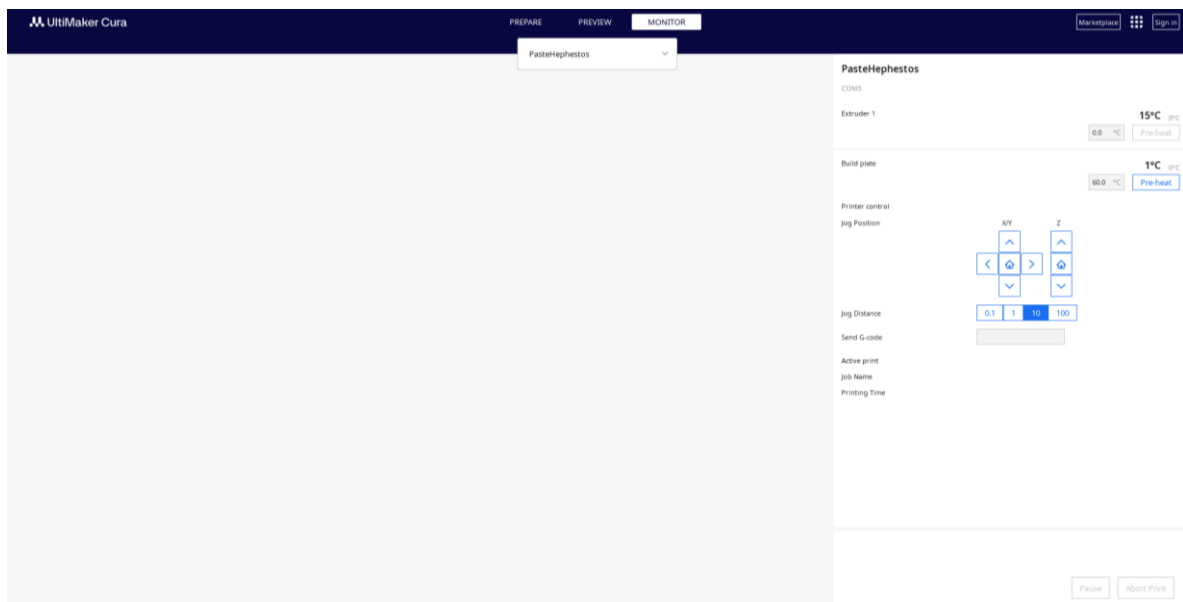


Figura 4.7 - Aba "monitor" que cotrola a movimentação do extrusor

A movimentação passo a passo da ponta permite então realizar qualquer deslocamento apropriado a cada momento.

Outro aspecto importante que é executado neste ponto é a visualização da percentagem já realizada, bem como a percentagem por realizar, do trabalho total da impressão em curso.

4.5.Criação e desenvolvimento da estrutura adotada para o estudo

Prosseguindo para o estudo concreto de pastas que possam demonstrar algum futuro para a dopagem de estruturas com compostos bioativos, vale a pena referir que optou-se por realizar os testes num modelo simples, mas simultaneamente com um grau tridimensional suficiente para que seja possível avaliar a fidelidade de forma e a capacidade estrutural que os compostos possam oferecer. Assim, foi desenvolvido um simples paralelepípedo no OpenSCAD, posteriormente ajustado com meros parâmetros no Ultimaker Cura.

No primeiro software apenas foi necessário referir três valores destinados ao comprimento, à largura e à altura do paralelepípedo, relacionando-os de seguida através da chamada da função “*cube*”. Os valores atribuídos nesse instante não são inalteráveis visto que no Ultimake Cura é possível alterá-los facilmente.

No segundo software, existe uma janela com diversos menus (Figura 4.8) onde há a possibilidade de definir diversos parâmetros, não só de estruturação como também da impressão que será efetuada. Os aspetos a que foi dedicada maior atenção dizem respeito à espessura da linha, ao tipo de preenchimento, à densidade do interior do objeto, à velocidade de impressão e ao modo de reprodutibilidade.

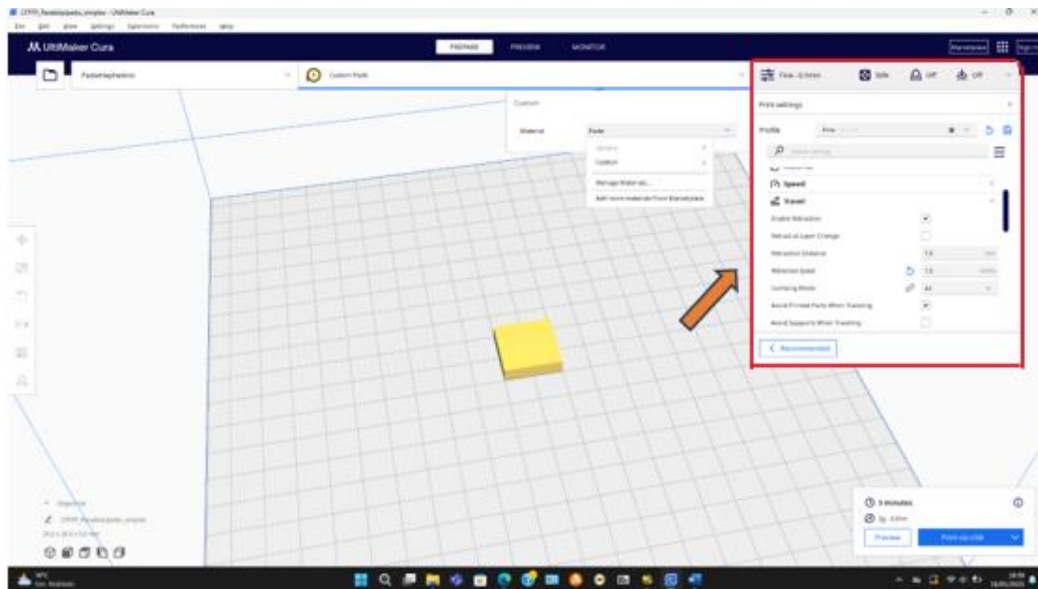


Figura 4.8 - Menus dedicados à estruturação do objeto e a modos de impressão

Para a primeira estrutura definida é de enumerar algumas características. O diâmetro da linha media 1.25 mm, o tipo de *infill* adotado foi o de linhas, a densidade interna rondou os 40% (podendo fazer-se variar esse valor para acertos de medidas), enquanto a velocidade de impressão foi definida a 10 mm/s. Os valores destes parâmetros foram então os atribuídos para as primeiras pastas, nomeadamente para aquelas que eram compostas por materiais mais líquidos como a de bicarbonato de cálcio, alginato de sódio ou metilcelulose.

Antes de proceder a cada impressão, o Ultimaker Cura permite obter uma visualização prévia do objeto que será impresso, mostrando cada detalhe, camada a camada, tanto do exterior como do interior da estrutura em causa (Figura 4.9). O *design* escolhido consistiu no formato simples de um paralelepípedo com linhas perpendiculares entre camadas, obtendo um *scaffold* estável e estruturalmente intuitivo de analisar.

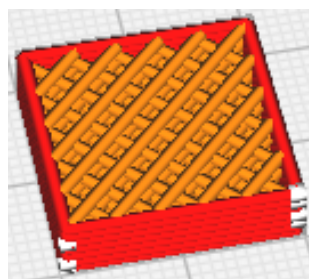


Figura 4.9 - Visualização prévia da impressão de estrutura com *infill* de linhas

4.6. Impressão do compósito formado por água, açúcar e carbonato de cálcio

Mais que uma pasta com possível futuro neste estudo, a primeira opção começou por ter o principal objetivo de adquirir experiência sobre o enchimento da seringa com o material de impressão, descobrir qual o bico de impressão mais vantajoso de acordo com a viscosidade da pasta e saber como se procederia os passos seguintes à impressão, sobretudo o momento da desidratação para atribuir a rigidez aos *scaffolds* obtidos.

A composição desta pasta é então de 70% de carbonato de cálcio, 15% de sacarose e 15% de água. A proporção de 1:1 entre a água e a sacarose cria uma pasta estável para a extrusão e para a atuação como um aglutinante perfeito ao carbonato de cálcio. A preferência por este começo deve-se ao sucesso ao nível da facilidade de impressão e de boa fidelidade estrutural posteriormente adquirida que um estudo anterior demonstrou [8]. Além disto, o carbonato de cálcio é um material que pode ser obtido na natureza, como por exemplo em conchas, sem que haja desta forma grandes fatores prejudiciais para o ambiente.

Na Figura 4.10 é possível observar três diferentes momentos do trabalho efetuado sobre esta primeira pasta. Na Figura 4.10a está captado um momento do processo de impressão, onde se consegue ver o detalhe e precisão da deposição do material. Já na Figura 4.10b temos o registo fotográfico de uma estrutura, a qual não demonstra os melhores resultados no que diz respeito à forma após a impressão. De seguida, na Figura 4.10c estão presentes vários exemplares, entre os quais alguns já com o sucesso pretendido nesta primeira fase do estudo.

Estas pequenas alterações, capazes de ter um impacto significativo visível no resultado, estão relacionadas com a distância da ponta à base de impressão, com o diâmetro da própria ponta de impressão, com a espessura pretendida para cada linha desenhada, como também relativamente à velocidade de deslocação da seringa ao longo, quer ao longo da deposição da pasta na base, quer imediatamente após a mesma.

Os parâmetros que permitiram os bons resultados da Figura 4.10c são, principalmente, a maior homogeneização possível adquirida pela mistura, o preciso controlo da posição inicial do processo, a impressão imediata a uma temperatura ambiente e a velocidade de deposição do compósito a 10 mm/s, sem esquecer a espessura da linha a rondar os 1,25 mm.

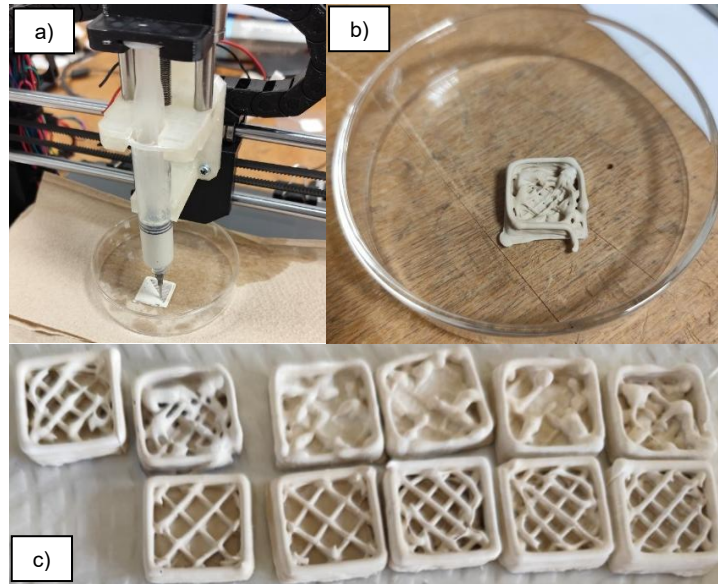


Figura 4.10 – a) Impressão da pasta de carbonato de cálcio; b) primeira impressão; c) evolução dos resultados

Desta primeira abordagem podemos admitir que a pasta formada por carbonato de cálcio, açúcar e água resulta num composto com características ideais para impressão 3D devido à boa viscosidade quando sujeita à compressão dentro da seringa, além da ótima capacidade estrutural, permitindo manter a forma do objeto impresso, quer durante a impressão (importante para uma deposição camada a camada), quer após a mesma. A baixa percentagem de água nesta composição possibilita que, durante o processo de desidratação (Figura 4.11), não haja a fragmentação das estruturas visto que estas já se encontram fortalecidas ao nível da sua densidade. Posto isto, o balanço adequado das quantidades dos materiais é um fator muito importante.

De referir ainda que o processo de desidratação resulta da colocação das estruturas impressas numa estufa, onde a temperatura está mantida por volta dos 65°C.



Figura 4.11 - Demonstração do processo de desidratação das estruturas impressas

Posteriormente, algumas destas estruturas foram sujeitas a temperaturas relativamente elevadas (umas a 900°C, outras 1100°C) para testar possíveis variações físicas e químicas, nomeadamente a rigidez, a dureza e a resistência à água. Esta mudança do

ambiente leva à carbonização do açúcar, provocando um aumento da dureza pelo processo de sinterização, uma diminuição da rigidez pela formação de carvão e a continuação da falta de resistência à água pela presença de óxido de cálcio, material cerâmico básico e reativo com água. O resultado deste composto e do pós-processamento resulta num material com algumas semelhanças à cerâmica [8].

4.7. Impressão do composto formado por água e alginato de sódio

Com o objetivo de verificar a diferença de propriedades adquiridas por cada mistura consoante o material utilizado, efetuou-se a substituição do constituinte carbonato de cálcio (inorgânico) pelo alginato de sódio (orgânico). Ao mesmo tempo, foi retirado o açúcar como agente aglutinante tendo em conta que o próprio alginato é capaz de cumprir essa função.

As tintas à base de alginato têm sido amplamente exploradas devido à sua elevada capacidade de atribuir uma textura de gel em casos de condições amenas, obtendo assim hidrogéis mecanicamente estáveis através da reticulação física, originando forças intermoleculares ião-dipolo entre cadeias ou complexos de cálcio. Isto acontece após a adição de iões de cálcio bivalentes, por exemplo, através de soluções para imersão [19].

Além disso, as tintas à base de alginato são biodegradáveis, não imunogénicas e não citotóxicas. Apresentam ainda propriedades viáveis para a integração de ambientes celulares, tendo em conta as suas propriedades elásticas [19], além de uma integridade pós-impressão e reticulação promissora.

Destacam-se na biomédica devido à boa capacidade de impressão, fidelidade de forma em estruturas 3D, biocompatibilidade, ativação de macrófagos e monócitos, atuando por isso de forma positiva, por exemplo, em casos de feridas e necessidade de proteção e reconstrução de tecidos de grande área como a pele [20]. O uso de alginato, um biopolímero natural extraído de algas marinhas, está aprovado pela FDA para casos de aplicação biomédica.

No entanto, face à pasta de carbonato de cálcio, a percentagem de peso do composto principal teve de ser alterada, tendo em conta a menor fluidez do alginato de sódio. Assim, a medição ideal para impressão ficou nos 5% de alginato de sódio, 5% de açúcar e 90% água. Apesar da capacidade de impressão atingida ter sido a ideal, o grande aumento da presença de água trouxe problemas ao nível da capacidade de manutenção estrutural após a impressão. Registou-se um colapso do objeto, resultando numa simples folha do composto. (Figura 4.12)

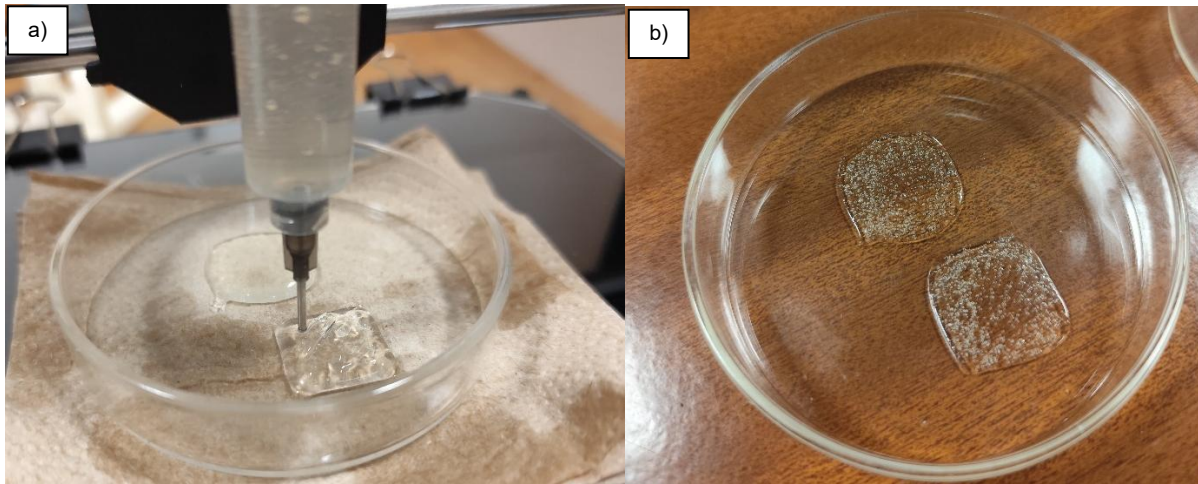


Figura 4.12 - Registo do trabalho e resultado com a pasta de alginato de sódio

Como é visível na Figura 4.12a, a introdução da mistura revelou-se exigente devido à necessidade da menor acumulação possível de bolhas de ar dentro da seringa de forma a evitar uma deposição intermitente. O registo do resultado após algumas horas, apresentado na Figura 4.12b, mostra a retenção desse ar após a solidificação da estrutura.

Apesar de todos os benefícios, o alginato tem rigidez mecânica limitada e requer suporte de iões cálcio para reticulação [20] e, portanto, é difícil usar o alginato de forma isolada para procedimentos construtivos de grandes *scaffolds*. Esta reticulação não foi implementada para esta pasta devido ao défice estrutural imediatamente evidenciado na deposição das camadas.

Estudos recentes têm proposto a incorporação de *gellan gum*, tendo em conta que esta confere uma gelificação praticamente irreversível por adição de catiões multivalentes [19]. Esta pode ser uma alternativa, mantendo a reticulação por iões cálcio adotada neste estudo.

4.8. Impressão do compósito formado metilcelulose e alginato de sódio

Perante os materiais disponíveis inicialmente, e com vista a aperfeiçoar a técnica e a sensibilidade à impressão e à combinação de materiais/parâmetros, foi ainda testado outro protocolo. Neste caso, foi incorporada a metilcelulose, sobre a qual já era conhecida a forte componente estrutural. No entanto, a capacidade de impressão ficou altamente comprometida devido à rigidez imediata adquirida pela metilcelulose quando combinada com água. Mesmo num processo rapidamente executado com 8% de metilcelulose, 2% de alginato de sódio e 90% de água, conseguindo evitar problemas durante a extrusão do material, o compósito não é suficientemente resistente para evitar o colapso estrutural a curto/médio prazo, isto é, após 30 min.

A metilcelulose tem a característica de ser solúvel em água, ao contrário da celulose (isto devido à rede altamente ordenada de ligações de hidrogénio formada por grupos hidroxilo e interações hidrofóbicas), além de exibir propriedades de gelificação térmica [21].

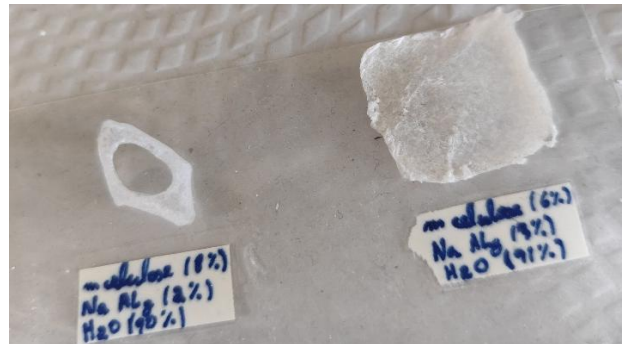


Figura 4.13 - Exemplares de tentativas de impressão da pasta com metilcelulose e alginato de sódio

No exemplar mais à direita na Figura 4.13, apesar da notável falta de forma anotada pela não aquisição de altura do modelo, tem como característica principal a resistência a forças de tração. Este comportamento deve-se à formação de uma rede polimérica contínua e flexível, fazendo com que as cadeias deslizem umas sobre as outras, reorganizando-se sob esforço e distribuindo a carga ao longo de toda a estrutura.

A estrutura que pode ser observada mais à esquerda caracteriza-se por ter uma maior dificuldade de impressão, por ter origem numa pasta mais espessa, mas também por possuir melhor capacidade estrutural após a impressão. Outra característica que ganhou relevância foi o facto desta estrutura adquirir uma alta elasticidade após ser sujeita a uma solução de iões cálcio. O sucesso da reticulação devido à presença do alginato de sódio é constatado na Figura 4.14.



Figura 4.14 - Comportamento elástico da estrutura de metilcelulose e alginato de sódio

4.9. Impressão do compósito formado alginato de sódio, quitosano e *kaolin*

Numa outra abordagem foram incluídos o quitosano e o *kaolin*, uma argila formada por minerais e alumínio. Esta fórmula teve por base um estudo já realizado onde se destacava a

boa capacidade de impressão desta pasta. Numa primeira fase de preparação existe a necessidade de diluir o alginato de sódio e o quitosano, este último com o auxílio de uma solução diluída de ácido acético dada a sua baixa solubilidade. Posteriormente, procede-se à adição do *kaolin* e à gelificação da mistura com o uso de cloreto de cálcio.

O uso de uma pasta que contenha alginato e quitosano proporciona a formação de um gel estruturalmente mais estável devido à criação de complexos polieletrólíticos. Estes complexos devem-se à atração electrostática entre polieletrólitos de cargas opostas. O quitosano é caracterizado por ter baixa toxicidade e boa biocompatibilidade. Sabe-se ainda que um gel composto por quitosano e alginato pode comportar-se melhor ao nível das suas propriedades mecânicas, de impressão e biológicas com a incorporação de hidroxiapatite [20].

Embora vários relatórios estejam disponíveis para o desempenho hemostático do *kaolin*, as suas referências para *scaffolds* em engenharia de tecidos ou preparação de biotinta bioimprimível 3D são bastante limitadas [20].



Figura 4.15 - Registo do trabalho e resultado com a pasta de alginato de sódio, *kaolin* e quitosano

Na Figura 4.15 é perceptível a boa relação desta pasta com a impressão 3D. Apesar de o *kaolin* ser um material inorgânico, a sua adição melhora as propriedades mecânicas, mantendo a forma da estrutura impressa. No entanto, nem o uso do processo pós-impressão utilizado, a reticulação por cloreto de cálcio, impede a perda de tamanho do objeto, dada a grande quantidade de água que evapora. Além disto, dada a incorporação de dois polímeros com cargas diferentes, o processo de reticulação terá de ser eventualmente alterado. De referir que, mesmo perante esta situação, o desenho interno mantém-se, demonstrando boas propriedades de suporte e de fidelidade de forma.

O *kaolin* tem ainda a grande vantagem de ter sido já aprovado pela *FDA* como um agente hemostático. A sua aplicação em hidrogéis ou *scaffolds* pode-lhes atribuir uma propriedade importante na regeneração de tecidos.

4.10. Impressão do compósito formado por água e hidroxiapatite

Para ter uma nova visão do potencial da impressão 3D, procedeu-se à produção de uma pasta apenas composta por hidroxiapatite e por um solvente, a água. A hidroxiapatite utilizada destaca-se por ser um material em pó, mas não ter a capacidade de se dissolver neste solvente e por se dissociar facilmente da água, embora acabe por conferir capacidade estrutural ao *scaffold*. Como tal, quando esta pasta é sujeita à compressão, há alguma dificuldade em garantir uma extrusão contínua, constante e consistente ao longo do tempo. A impressão de estruturas desta composição demonstrou ainda uma fragilidade após a desidratação, registando-se evidências de fragmentação mesmo em peças mais densas, como a da Figura 4.16. A sua aplicação fica comprometida sem o uso de um aglutinante.

Esta desagregação facilitada da água significa a existência de alguns problemas quando estamos perante uma mistura feita de um único material sólido, em pó, como é o caso da hidroxiapatite. A combinação com substâncias mais aglutinantes pode ser o segredo para o aperfeiçoamento das propriedades físicas e viscoelásticas na impressão e para o momento de pós-impressão destas estruturas, aproveitando assim a fidelidade de forma que se destaca quando utilizado este fosfatado de cálcio para a formação dos compósitos.

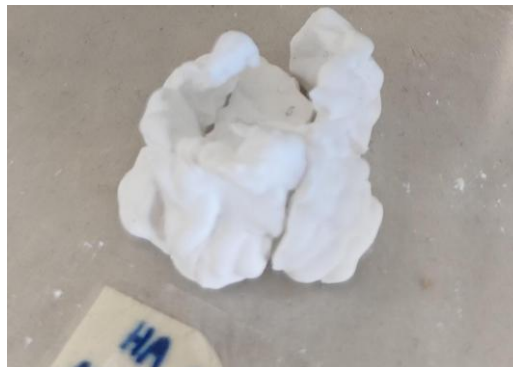


Figura 4.16 - *Scaffold* de compósito com 44% de hidroxiapatite e 56% de água

4.11. Impressão do compósito formado por água, hidroxiapatite e açúcar/alginato

Tendo em consideração as propriedades físicas que a hidroxiapatite consegue oferecer, foram testadas novas pastas com este promissor biomaterial. As opções escolhidas para a combinação foram o alginato de sódio e o açúcar.

No caso onde a hidroxiapatite foi misturada com água e alginato de sódio verificou-se uma mediana facilidade de impressão, bem como a aquisição de uma rigidez considerável

após a impressão, boa fidelidade de forma, mas também ligeira propensão para a fragmentação.

Já para a pasta onde a hidroxiapatite foi combinada com água e açúcar destaca-se a capacidade de extrusão, uma aparente capa protetora adquirida após a desidratação e a mínima fidelidade pela estrutura desenhada para a impressão.

Estas características são em parte provenientes do açúcar ou do alginato de sódio, mostrando-se um bom aglutinante para o pó de hidroxiapatite.

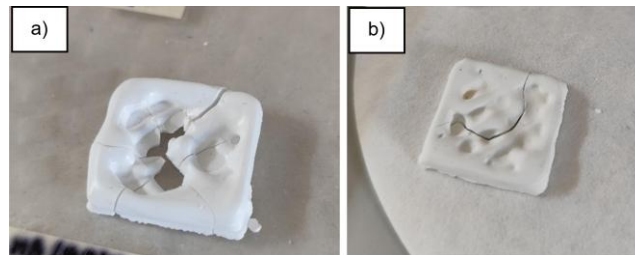


Figura 4.17 - a) *Scaffold* com 48% de hidroxiapatite, 23% de açúcar e 29% água; b) *scaffold* de composto com 43% de hidroxiapatite, 1% de alginato de sódio e 56% água

Realizando uma comparação com a Figura 4.16, na Figura 4.17a está testemunhada uma mudança superficial, com a adição de açúcar a atribuir uma “plastificação” ao *scaffold*. Já na Figura 4.17b, a junção de alginato de sódio à hidroxiapatite demonstra um resultado relativamente fiel à estrutura predefinida e praticamente sem défices de agregação.

4.12. Impressão do composto formado por água e álcool polivinílico

Outro material com boas propriedades físicas estudado foi o álcool polivinílico. Este destaca-se principalmente pela alta viscosidade que confere às misturas onde é constituinte.

No entanto, logo no momento da mistura do PVA com o solvente, neste caso a água, verifica-se a formação de bolhas de ar, fator que dificulta a tarefa que se segue, a impressão por extrusão. Este cenário constatou-se, não registrando qualquer semelhança entre a estrutura obtida e a forma que se pretendia para o *scaffold* delineado (Figura 4.18). Este polímero caracteriza-se por ser solúvel em meio aquoso e não formar por si só uma rede 3D.



Figura 4.18 - Tentativa de impressão de uma estrutura à base de pasta de PVA

O comportamento observado surge, nomeadamente, devido ao comportamento reológico inadequado, isto é, pela fluidez excessiva e pela inconsistência da extrusão da pasta ao longo do tempo de impressão devido à acumulação de ar na seringa. Desta dificuldade optou-se por não insistir neste material, sem esquecer que se destaca na área farmacêutica por ser um bom revestimento para comprimidos, por não transmitir odor, por não ser tóxico, por ser resistente a gorduras e óleos, além de conter propriedades mecânicas como ser dúctil, forte e flexível [22]. Tratando-se de um polímero sintético hidrossolúvel, necessita de sofrer reticulação das suas cadeias para adquirir propriedades de pasta ou gel, não sendo a reticulação por cloreto de cálcio a mais indicada.

4.13. Definição dos parâmetros da nova estrutura

Após o trabalho com as pastas onde havia maior preponderância de hidroxiapatite, decidiu-se adaptar um dos parâmetros de forma a corrigir aspetos relacionados com a falta de adesão e com a fragmentação do composto. Esta alteração é executada no Ultimaker Cura, mais concretamente na aba dedicada ao *infill* do objeto a imprimir.

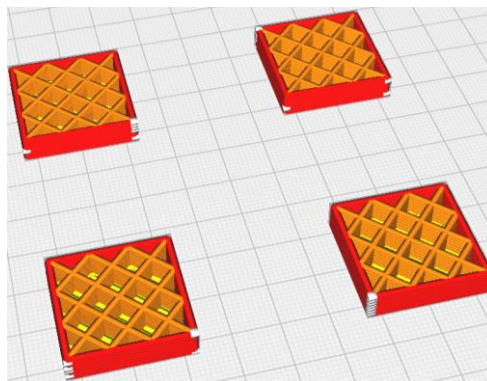


Figura 4.19 - Nova estrutura criada com *infill* de grelha e reprodutibilidade automática

Este novo esquema tridimensional (apresentado na Figura 4.19) permite que a cada nova camada impressa haja uma outra de sustentação totalmente plana, isto é, sem picos de quantidade de material nos vértices e sem valas que eram características das arestas. Esta transformação notória, como mostra a Figura 4.20, foi alcançada alterando o parâmetro *infill pattern*, deixando o padrão de linhas (*lines*) para adotar o padrão de grelha (*grid*).

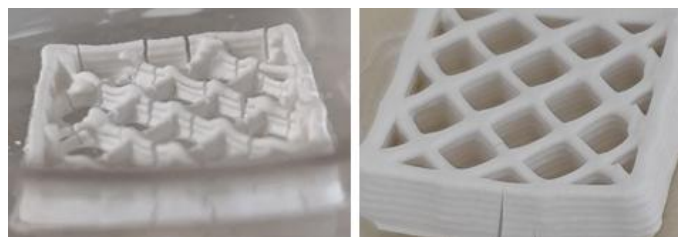


Figura 4.20 - Tipos de *infill pattern*: a) linhas; b) grelha

4.14. Compósito com melhor resultado na impressão 3D

Após o estudo dos vários efeitos, propriedades e consequências que cada material produzia no fim da impressão e dos processos pós-impressão, concluiu-se que a fórmula mais promissora para um compósito firme e viável para a incorporação de antibióticos teria de combinar a hidroxiapatite (responsável pela capacidade estrutural), o alginato de sódio (agente capaz de atribuir propriedades gelificantes à mistura) e o açúcar (favorável à impressão pela plasticidade e viscoelasticidade).

Assim, foram desenvolvidos vários compósitos, variando as quantidades de cada componente, até alcançar o “ideal”, isto é, aquele que demonstrasse a melhor capacidade de impressão e a maior fidelidade à estrutura programada. O exemplar que melhor demonstra o sucesso deste compromisso é o que está apresentado na Figura 4.21.

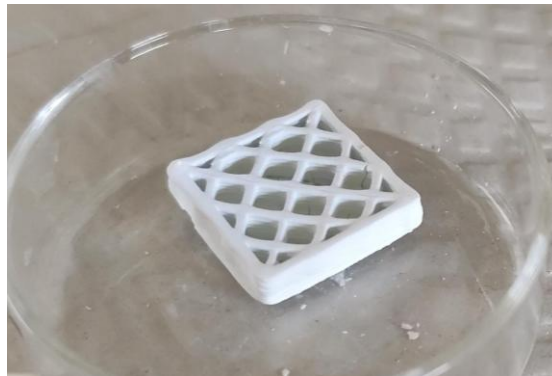


Figura 4.21 - *Scaffold* com as melhores propriedades estruturais obtidas

A matriz obtida para este promissor compósito é então formada por 37,5% de hidroxiapatite, 38% de açúcar, 0,5% de alginato de sódio e 24% de água. No entanto, o modo implementado para a evaporação do solvente ainda é uma situação a melhorar, com vista a permitir a reprodutibilidade destes *scaffolds*.

Algumas das estruturas foram colocadas em mufla e expostas a 1100°C durante 15 min, o que levou à adesão das mesmas à base onde estavam apoiadas, fazendo com que a diminuição do tamanho dessas estruturas, provocada pela perda da água, resultasse na fragmentação pela falta de elasticidade sem esse solvente.

4.15. Balanço dos resultados da impressão

De forma a organizar todo o trabalho desenvolvido sobre a impressão 3D, foi criado um género de catálogo que identifica e diferencia cada *scaffold* de acordo com os materiais envolvidos na criação do respetivo compósito. As estruturas numeradas na Figura 4.22 foram

as selecionadas para os próximos ensaios de impregnação e libertação e as suas composições são apresentadas na Tabela 4.1, com as respetivas quantidades a referirem-se após a evaporação do solvente depois da impressão.

Tabela 4.1 – Estruturas selecionadas e os seus materiais

Número do compósito	Composição da amostra (% da massa)	Identificação da amostra
1	Carbonato de cálcio (82%) e sacarose (18%)	Carbonato de cálcio
4	Metilcelulose (67%) e alginato de sódio (33%)	Metilcelulose
12	Alginato de sódio (58%), kaolin (36%), quitosano (4%) e cloreto de cálcio (2%)	Alg-kaolin
16	HA (95%) e alginato de sódio (5%)	HA-Alg
20	HA (53%), sacarose (46,7%) e alginato de sódio (0,3%)	HA-sacarose



Figura 4.22 - Catálogo de todas as pastas utilizadas com pequenas amostras

Para analisar as estruturas impressas no que diz respeito à sua composição e propriedades procederam-se a algumas técnicas em particular e que são abordadas de seguida. A adoção desta medida teve como principal propósito realizar comparações entre exemplares desenvolvidos de forma a identificar vantagens, desvantagens e estudos futuramente mais promissores.

De referir que o *scaffold* com o melhor resultado vindo da impressão não prosseguiu para os estudos e análises seguintes. Primeiramente, a falta de exemplares com o design intacto é insuficiente para todas as análises comparativas. Além disso, outros compósitos têm os mesmos componentes, sendo suficiente para retirar as primeiras relações por analogia.

4.16. Impregnação de antibiótico nas estruturas impressas

Após a impressão de diferentes matrizes, procedeu-se à tentativa de atribuir uma propriedade antimicrobiana a alguns dos tipos de *scaffolds*. De todos os compósitos desenvolvidos e avaliados ao nível da impressão, foram selecionados para os novos testes aqueles que demonstraram maior potencial estrutural para futuros estudos, e aqueles que se diferenciavam entre eles ao nível da composição.

O antibiótico que foi testado para impregnação nas estruturas foi a sulfanilamida. Para isto, houve a necessidade de dissolver o composto numa solução de etanol, visto ser este o solvente onde o antibiótico se mostra ser mais solúvel. O objetivo passou por criar a solução mais concentrada possível, resultando daqui uma solução diluída de 2,5% (m/v).

Colocando cerca de 10mL de solução num copo, cada estrutura foi mergulhada até ficar submersa, onde permaneceu durante 45min. Quando finalizada esta etapa, todas as estruturas foram deixadas a secar com o propósito de evaporar o etanol e tentar deixar impregnado o antibiótico na matriz impressa.

Com o intuito de analisar se o antibiótico ficou contido/armazenado nos poros existentes, as peças foram enviadas para um laboratório, no qual células foram presentes a essas estruturas possivelmente portadoras da sulfanilamida.

5. Resultados e Discussão

5.1. Testes de citotoxicidade e de dispersão

De forma a avaliar os parâmetros e os níveis de citotoxicidade e de dispersão do material num meio ambiente a que é sujeito, realizaram-se testes a estruturas de diferentes composições.

Após a impressão 3D e a reunião dos vários exemplares desenvolvidos, fez-se a seleção de um grupo diversificado para que fosse avaliada a absorção de um antibiótico por parte de cada *scaffold*. Estas estruturas foram posteriormente expostas a um ambiente bacteriano com o objetivo de averiguar se havia libertação desse antibiótico incorporado.

De acordo com a numeração atribuída e que está representada na Figura 4.22, as amostras que foram escolhidas foram as referenciadas pelos números 1, 4, 12, 16 e 20. Os cinco exemplares tiveram o seu comportamento biológico avaliado face à presença de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

No ramo da microbiologia, as bactérias podem ser divididas em duas grandes classes, as gram-negativas e as gram-positivas. Mais concretamente, as duas espécies de bactérias utilizadas para o estudo foram a *E.coli* e a *S.aureus*, respetivamente gram-negativa e gram-positiva.

Por um lado, as bactérias gram-negativas caracterizam-se por ter uma parede celular menos espessa, isto é, uma camada mais fina de peptidoglicanos, além de conterem lipopolissacarídeos, responsáveis por processos de inflamação e por provocarem uma resposta por parte do sistema imunológico [25,26].

Por outro lado, as bactérias gram-positivas possuem uma parede celular mais densa, com mais densidade de peptidoglicanos (coloração violeta/roxo), são a causa da maioria das infeções na corrente sanguínea e são mais características em formas de cocos ou bacilos [25,26].

Nas seguintes figuras estão os resultados da análise para a inibição de crescimento bacteriano de bactérias gram-negativas, as *E.Coli*.

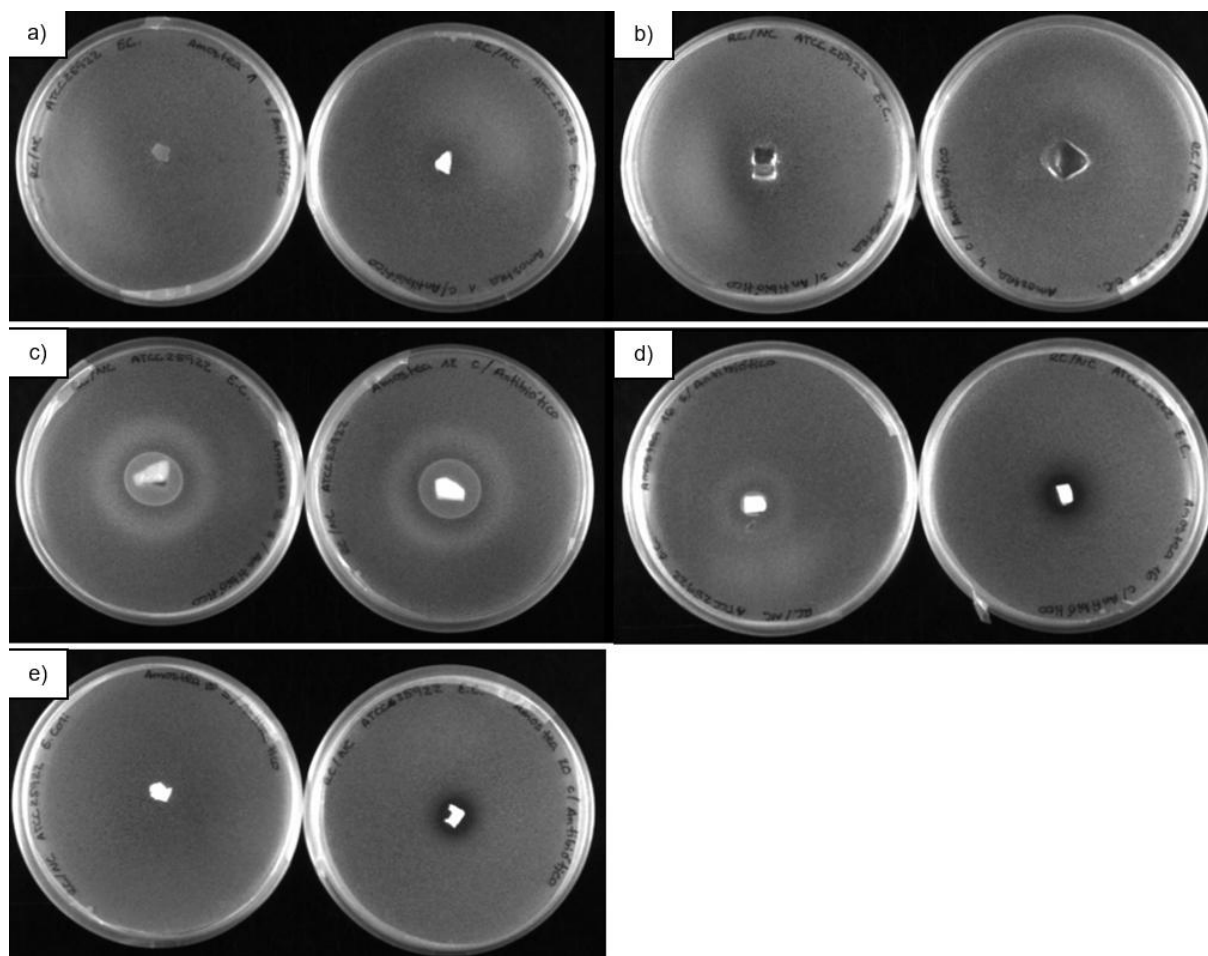


Figura 5.1 - Resultados das culturas de bactérias *E. coli* sujeitas ao antibiótico sulfanilamida impregnado em estruturas de diferentes composições: a) compósito 1; b) compósito 4; c) compósito 12; d) compósito 16; e) compósito 20

Na Figura 5.1 está representada a visualização daquilo que é cultura de bactérias *E.coli* e a sua manifestação face à presença do antibiótico. Para os casos com as estruturas 1 (Figura 5.1a) e 4 (Figura 5.1b) é possível aferir que não houve inibição da proliferação bacteriana, visto que não se visualiza qualquer diferença visual entre as proximidades e os locais mais afastados dos *scaffolds*. O ensaio à exposição da estrutura 12 (Figura 5.1c) é marcado pela mancha circular esbranquiçada em seu redor, o que indica a decomposição da estrutura. Por fim, relativamente aos casos das estruturas 16 (Figura 5.1d) e 20 (Figura 5.1e) existe uma inibição do crescimento dos índices bacterianos demonstrada pelas áreas mais escuras presentes no ambiente sujeito aos *scaffolds* que incorporam a sulfanilamida.

Nas seguintes figuras estão os resultados da análise para a presença das bactérias gram-positivas, as *S.aureus*.

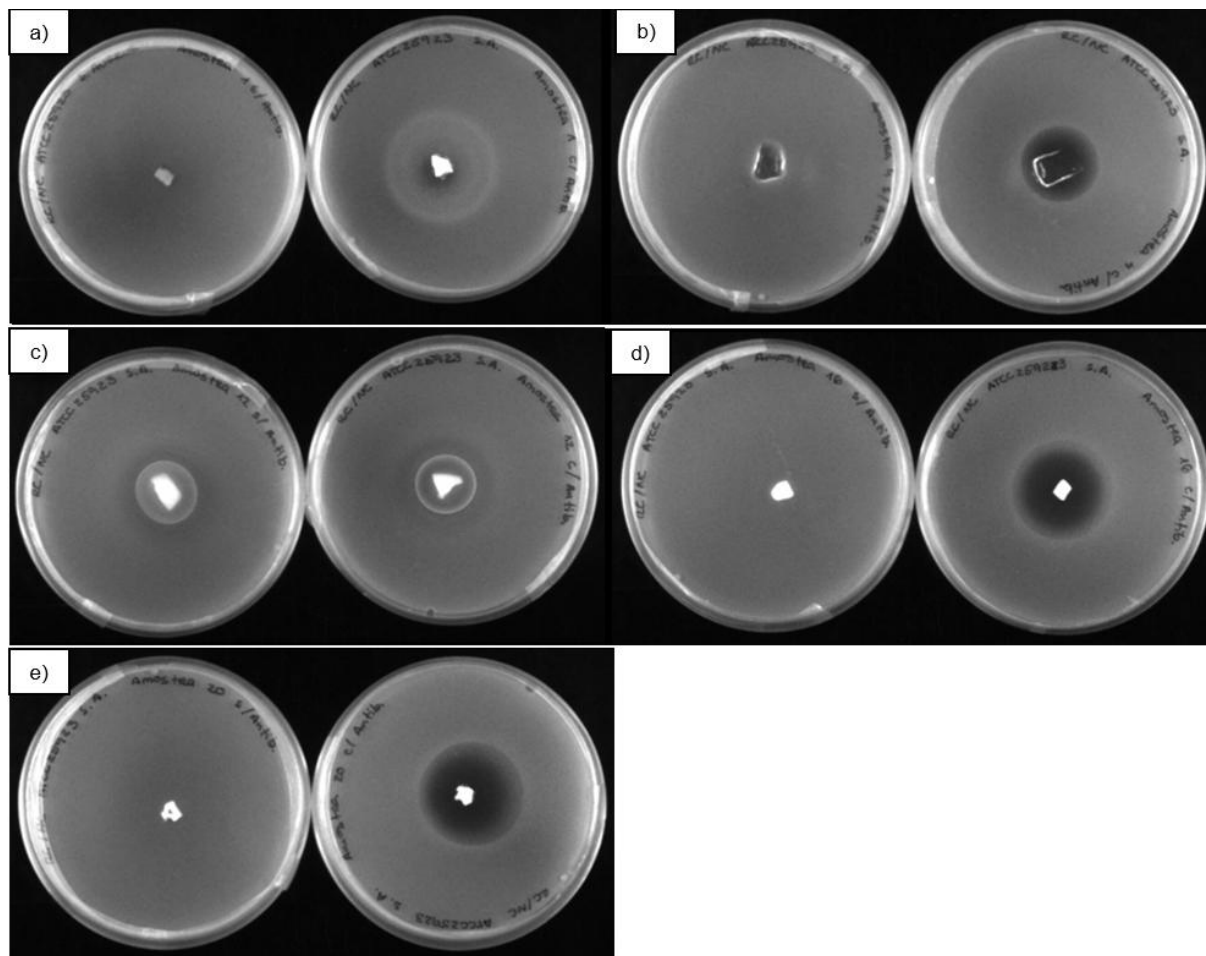


Figura 5.2 - Resultados das culturas de bactérias *S. aureus*. sujeitas ao antibiótico sulfanilamida impregnado em estruturas de diferentes composições: a) composto 1; b) composto 4; c) composto 12; d) composto 16; e) composto 20

Para esta espécie de organismos, as bactérias *S.aureus*, constata-se que há uma diferença clara do comportamento relativamente à propagação da cultura entre os ensaios com e sem antibiótico. Apenas para a estrutura referenciada com o número 12 (Figura 5.2c) registou um resultado insignificante, não permitindo admitir que houve incorporação e/ou libertação da sulfanilamida.

Analisando a globalidade dos resultados provenientes do laboratório, conclui-se que para os casos de gram-negativas registaram-se perspectivas de inibição em ambientes expostos às estruturas 16 (Figura 5.1d) e 20 (Figura 5.1e). Por outro lado, para os casos de gram-positivas, além das inibições nos ambientes sujeitos às mesmo estruturas 16 e 20, também o ambiente exposto à estrutura 4 registou inibição do crescimento bacteriano.

Na tentativa de descobrir qual a razão para não ter havido inibição do crescimento de bactérias foram repetidos os ensaios para pelo menos esses três casos.

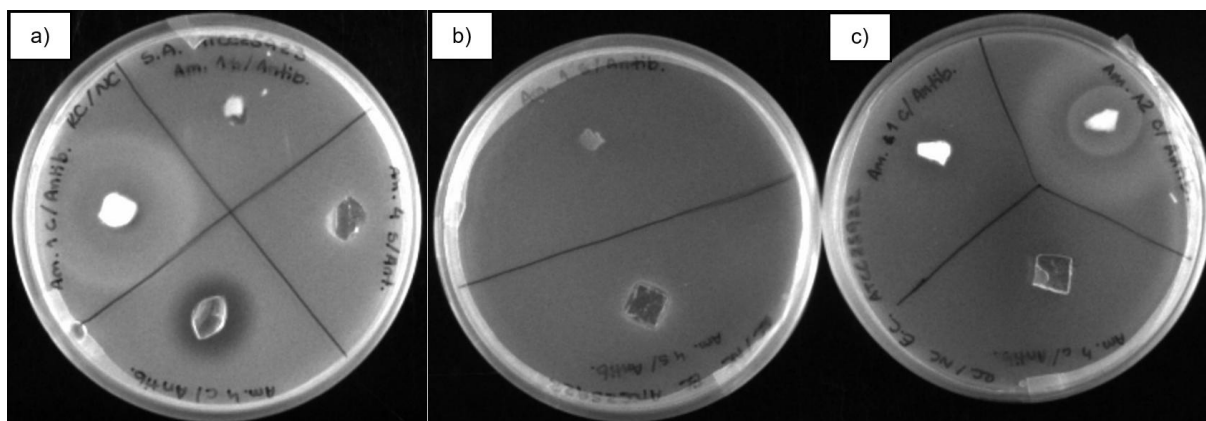


Figura 5.3 - a) Ensaio duplicado para a *S. aureus*; b) ensaio duplicado sem antibiótico para a *E. coli*; c) ensaio duplicado com antibiótico para a *E. coli*

Através da Figura 5.3 verificamos que para o caso da amostra 1 em ambiente com *S. aureus* (à esquerda na Figura 5.3a) surge uma área mais clara em torno do *scaffold* dopado com sulfanilamida, sinal que indicará a degradação gradual da estrutura. Já relativamente ao ensaio em ambiente com *E. coli*, o teste que tem a incorporação do antibiótico (à esquerda na Figura 5.3c) demonstra uma muito tênue zona de inibição, o que significa que a dose é irrelevante para o efeito pretendido.

É ainda possível constatar que continuou a haver a disparidade ao nível da inibição para a amostra 4, face ao tipo de bactéria a que foi exposta (para *S. aureus*, à direita e em baixo na Figura 5.3a; para *E. coli* em baixo nas Figuras 5.3b e 5.3c).

A amostra 12 com a impregnação da sulfanilamida e com a sua introdução no meio de *E. coli* registou precisamente o mesmo resultado do primeiro ensaio, isto é, a decomposição da matriz que dificulta a análise sobre a presença do medicamento.

5.2. Análise morfológica

Existem dois tipos de microscopia: a microscopia ótica e a microscopia eletrónica de varrimento. A microscopia ótica, a técnica mais antiga, caracteriza-se por ser simples, baseada no trabalho com fonte luminosa, utilizando uma/duas lente(s) apenas capaz de ampliar até 1000x, possível para observar amostras pequenas e finas, com manutenção de menor custo e fornecendo ao utilizador uma visualização com as cores reais do objeto [23].

A microscopia eletrónica de varrimento é baseada na emissão de um feixe de eletrões e é capaz de ampliar até 300000x. Atualmente, fornece informações nanométricas, sendo que aparelhos modernos conseguem ampliar até 1000000x. Fornece ao utilizador um campo detalhado com imagem em escala de cinza [23].

A análise por microscopia eletrônica de varrimento é uma técnica que permite obter informações detalhadas sobre a superfície de uma determinada amostra, bem como sobre a sua estrutura interna.

O equipamento utilizado para este estudo emite um feixe de elétrons de alta resolução, podendo atingir a gama do nanómetro. Quando existe essa emissão vários elétrons interagem com a amostra, provocando a reflexão de uns e refração de outros. Ao serem recolhidos pelos recetores e amplificados os seus sinais torna-se possível criar uma imagem que mostre com precisão e detalhe a superfície da amostra. Esta imagem é obtida através da digitalização de uma varredura realizada por um tubo de raios de cátodos. Todo este processo deve ser realizado num ambiente de vácuo para que o feixe de elétrons não colida com moléculas gasosas [24].

A técnica por análise SEM começou por ter um foco enorme na área alimentar, ao analisar alimentos e os seus constituintes.

Realizou-se uma análise SEM com o objetivo de observar com maior detalhe a superfície de quatro das cinco estruturas escolhidas.

Nas figuras que se seguem estão representadas as visualizações das topografias para ampliações na ordem das 200x e das 3000x, sendo a sequência de amostragem respeitada pela numeração atribuída no momento de catalogação.

5.2.1. Análise SEM realizada à estrutura impressa com o compósito 1

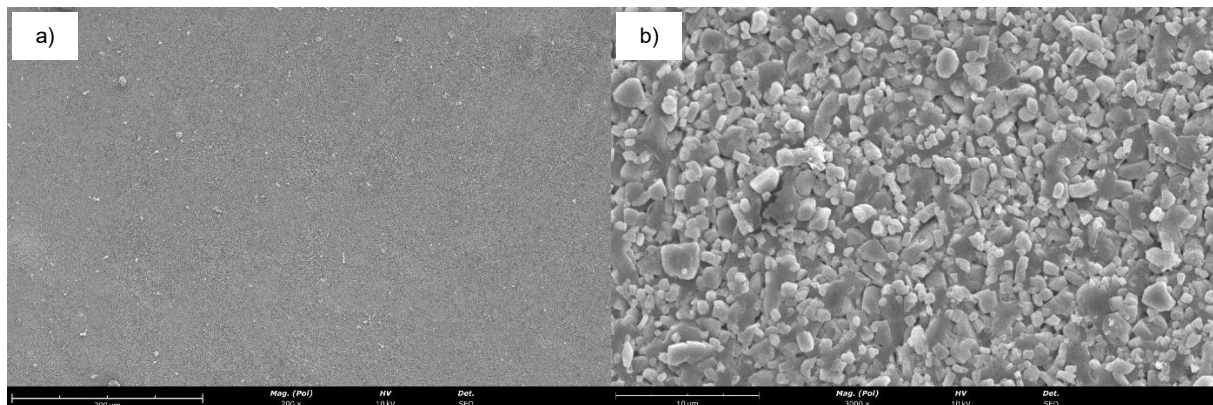


Figura 5.4 - Análise SEM ao compósito 1: a) 200x; b)3000x

Analisando as imagens da Figura 5.4 é possível detetar na imagem “a)” diversos pontos brancos espalhados de forma aleatório na superfície da matriz principal. Sendo o constituinte principal o carbonato de cálcio, as presenças fogazes desses pontos podem representar algumas das partículas de sacarose que não tenham ficado totalmente dissolvidas. Por outro lado, na imagem “b)”, observa-se a falta de uniformidade no tamanho dos grânulos, sugerindo que a trituração manual do pó de giz e/ou o processo de desidratação

não permite a aquisição desta propriedade. Apesar disto, a imagem da estrutura não transmite a ideia de uma superfície topograficamente irregular.

5.2.2. Análise SEM realizada à estrutura impressa com o compósito 4

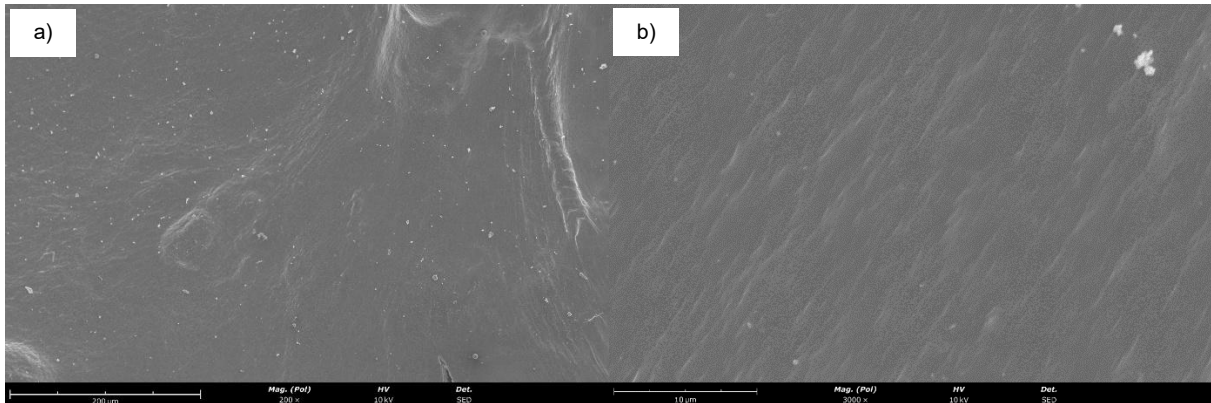


Figura 5.5 - Análise SEM ao compósito 4: a) 200x; b)3000x

Ao visualizar ambas as imagens da Figura 5.5 (“a” e “b”) é possível identificar não só as partículas brancas espaçadas entre si de forma irregular (Figura 5.5a), como também uma aparente superfície relativamente laminar ou estriada (Figura 5.5b). De referir que não existem outros pormenores ou grandes irregularidades a estas escalas.

5.2.3. Análise SEM realizada à estrutura impressa com o compósito 12

A amostra composta por alginato de sódio, quitosano e *kaolin* foi submetida a esta técnica de análise e seus resultados estão na Figura 5.6.

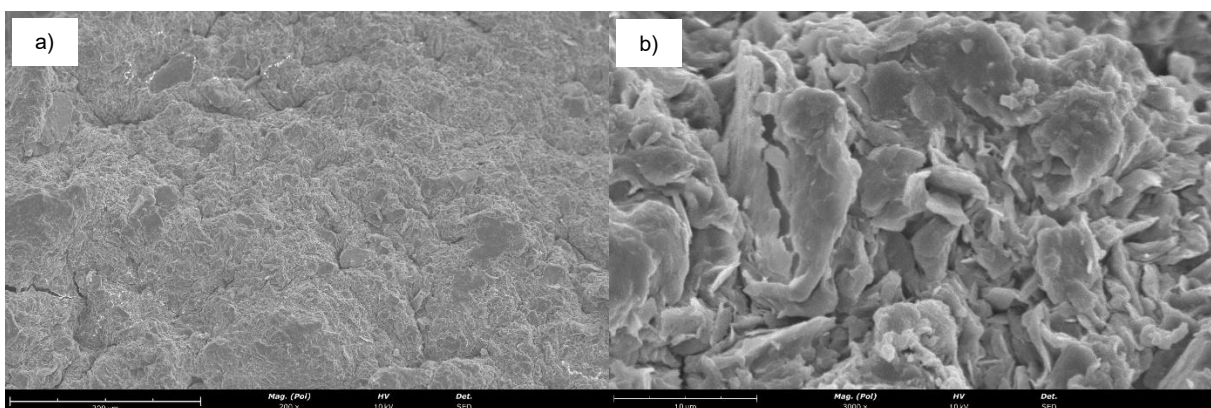


Figura 5.6 - Análise SEM ao compósito 12: a) 200x; b)3000x

Observando as imagens SEM acima, consegue-se admitir uma superfície bastante irregular com diversos tamanhos identificáveis para as partículas. A não dissolução do *kaolin* em água, solvente utilizado para a formação dos compósitos, pode ser um fator que ajuda a

explicar certa inconsistência na formação da estrutura, acrescentando ao facto de ele apenas ser incorporado após a aplicação do cloreto de cálcio. O quitosano, um material apenas solúvel em diluições ácidas, pode ter contribuído para esta característica.

5.2.4. Análise SEM realizada à estrutura impressa com o compósito 16

Já sobre a amostra composta por hidroxiapatite, açúcar, alginato de sódio e água temos a sua análise SEM apresentada de seguida na Figura 5.7.

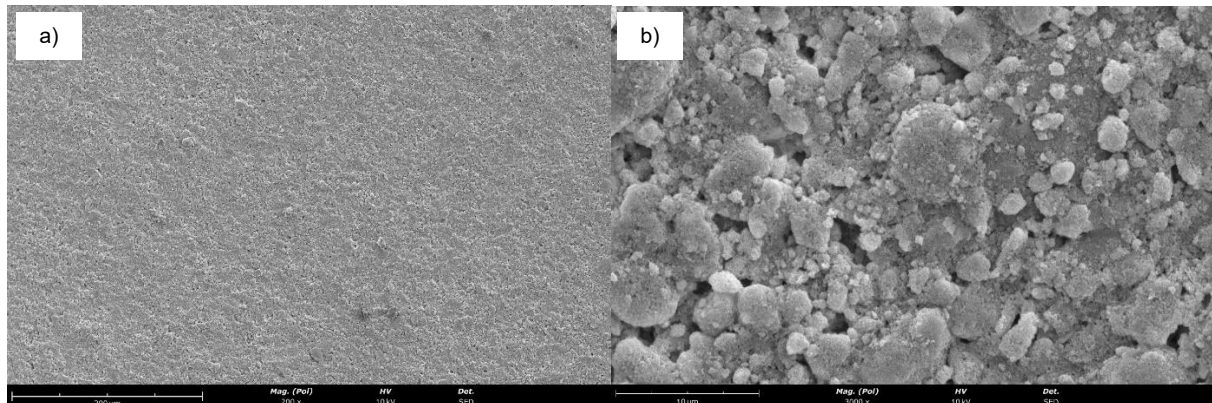


Figura 5.7 - Análise SEM ao compósito 16: a) 200x; b)3000x

Através da visualização da imagem “a)” verifica-se uma superfície aparentemente homogénea de partículas finas. Ao aumentar a resolução (imagem “b”) observam-se grânulos de várias dimensões, mas o destaque vai para a existência de alguns muito pequenos, na ordem dos 2 µm.

5.2.5. Análise SEM + EDS realizada à amostra impressa com o compósito de 12

Além desta visualização de SEM, que permite uma análise morfológica, da homogeneidade e da textura da superfície, quando combinada com a elaboração de uma Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia (EDS), tem a particularidade de identificar os elementos químicos presentes na amostra, como o carbono, o oxigénio, o ferro e o silício. Assim, os gráficos das Figuras 5.9 e 5.10 mostram quais os elementos detetados e em que quantidade naquela dada área exposta à análise.

Este complemento nasce da constatação da existência de zonas díspares no *scaffold* impresso com a mistura 12 ao nível da morfologia, como é o caso das zonas 1 (zona mais central na Figura 5.8) e 2 (zona mais acima na Figura 5.8), ambas rodeadas a cor azul numa imagem SEM realizada à escala de 690x.

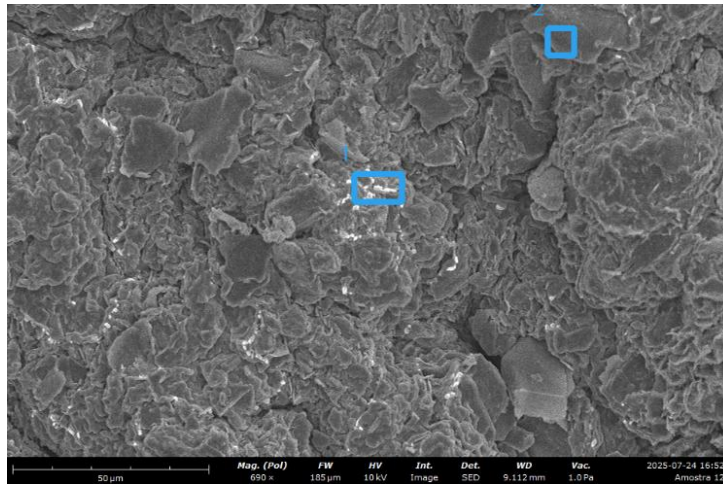


Figura 5.8 - Zonas "1" e "2" analisadas em EDS

Os elementos químicos presentes nas zonas 1 e 2 estão destacados nos picos dos espectros de EDS, representados nas Figuras 5.9 e 5.10, respetivamente.

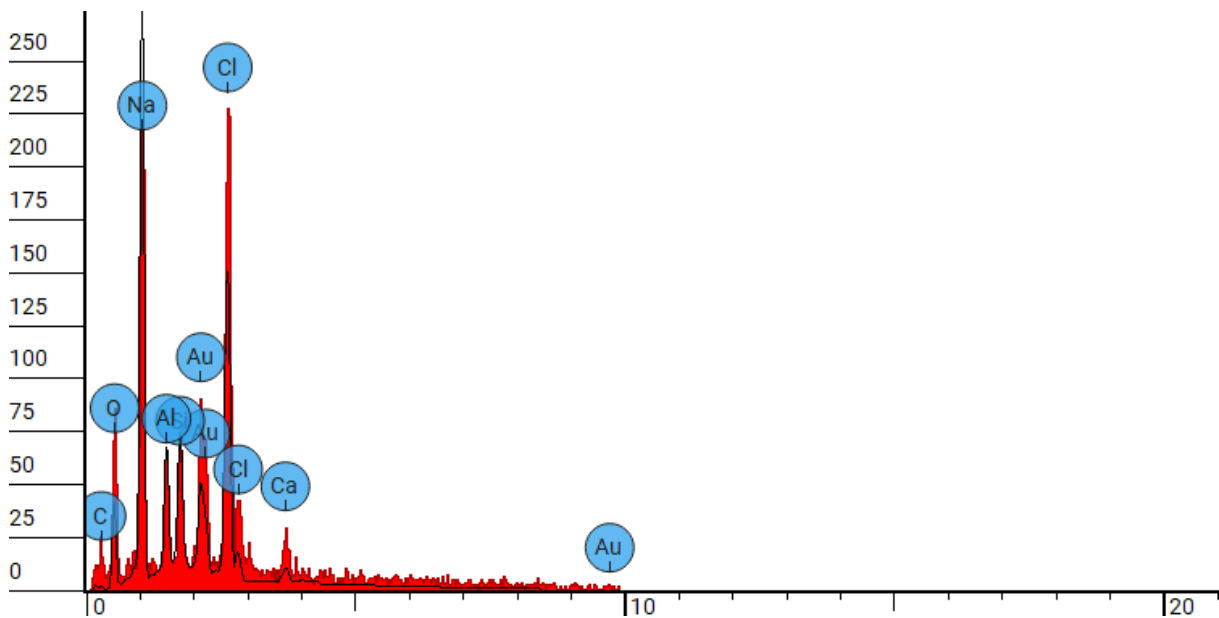


Figura 5.9 - Espectro EDS referente à zona 1 da amostra 12

Na primeira zona, os altos vestígios de cloro surgem da reticulação realizada, enquanto a presença do sódio tem origem no alginato de sódio. Nesta zona houve uma menor concentração dos elementos característicos do *kaolin*, nomeadamente do alumínio e do silício.

Já na zona 2, os elementos que sobressaem mais são aqueles que fazem parte da estrutura química do *kaolin* e do quitosano, contrastando com a menor força de presença por parte dos elementos do cloreto de cálcio.

Esta análise pode confirmar a dificuldade da obtenção de uma mistura microscopicamente homogénea para este compósito de boa resolução em termos de impressão 3D.

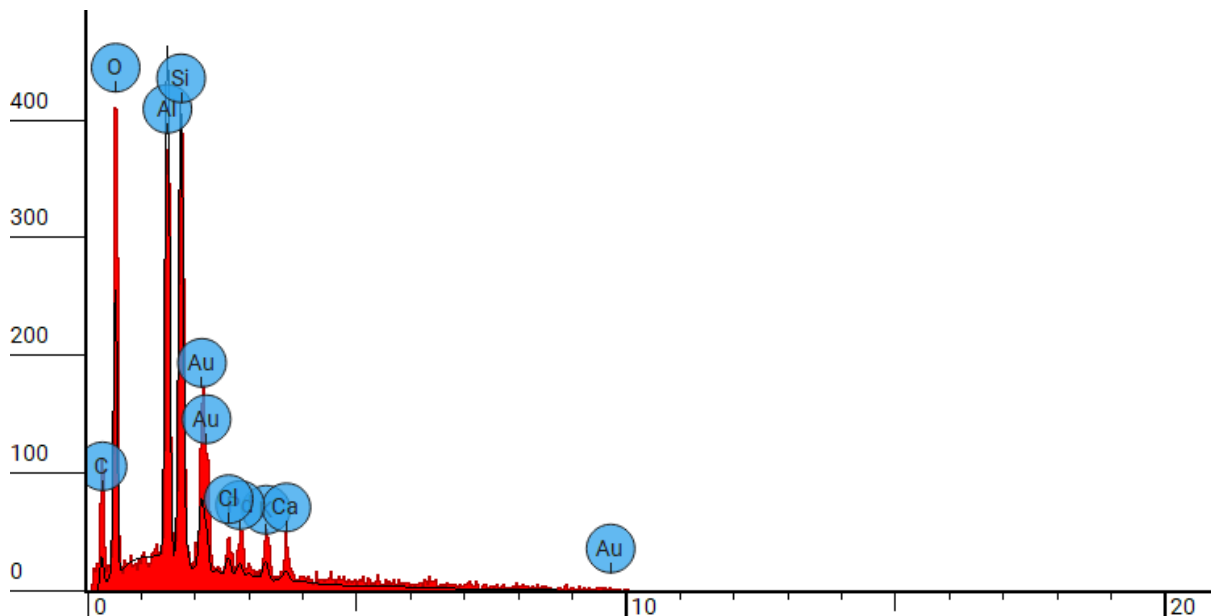


Figura 5.10 - Espectro EDS referente à zona 2 da amostra 12

É de referir que a presença de ouro na amostra está relacionada com o método adotado para prevenir a acumulação de carga e a danificação da estrutura, característica em objetos compostos por materiais não condutores, tal como para proporcionar maiores resoluções visto que este metal impulsiona a relação sinal-ruído produzindo uma imagem com maior clareza [27].

5.3. Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR da sulfanilamida apresenta-se na Figura 5.11.

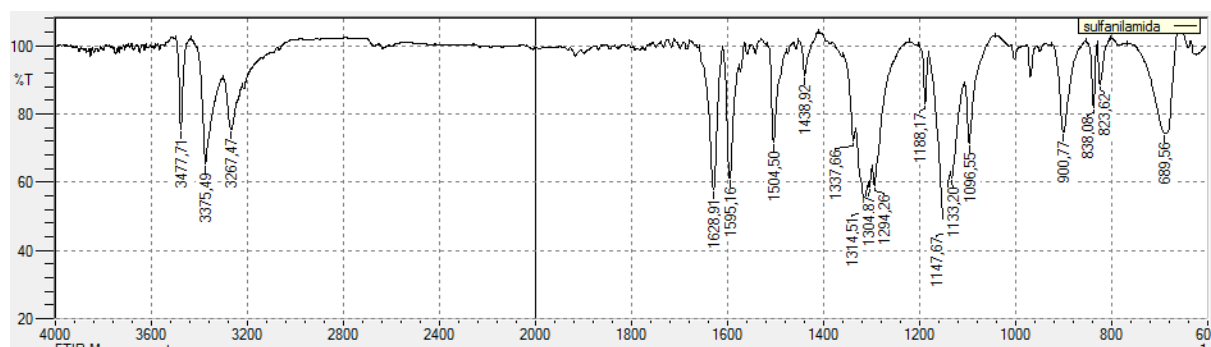


Figura 5.11 - Espectro FTIR da sulfanilamida pura

No espectro da Figura 5.11 é possível identificar as vibrações características da sulfanilamida pura. As três bandas assinaladas acima dos 3000 cm^{-1} representam as ligações N-H do grupo sulfonamida. As bandas a 1595 e 1629 cm^{-1} são evidências das ligações C=C

aromáticas. O grupo de bandas entre os 1290 e os 1340 cm^{-1} referem-se às ligações S=O. A banda mais forte a 1148 cm^{-1} faz-se sentir pela conjugação das ligações S=O e C-N da sulfanilamida. As bandas a frequências ainda mais baixas dizem respeito às ligações C-H fora do plano do anel aromático.

5.3.1. Análise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 1

A primeira amostra analisada por FTIR foi a denominada de amostra de carbonato de cálcio, composta pelo carbonato de cálcio, açúcar e água. Ao espectro desta amostra, representado a vermelho, sobrepõe-se o espectro da estrutura dopada com a sulfanilamida, que pode ser visto a preto (Figura 5.12).

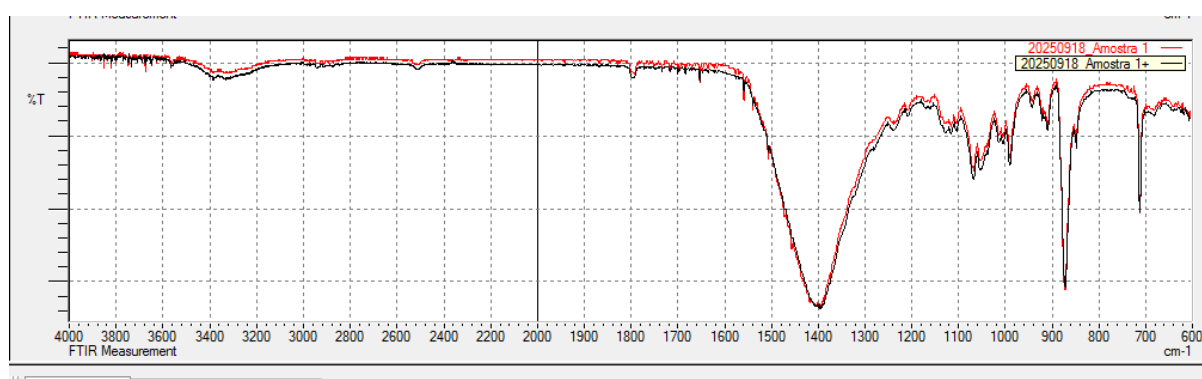


Figura 5.12 - Espectro FTIR do *scaffold* de compósito 1

Relativamente à identificação das bandas vibracionais, a que está posicionada a 1395 cm^{-1} refere-se ao grupo CO_3^{2-} (estiramento assimétrico), presente no carbonato de cálcio que se destaca por ser, sem margem para dúvidas, o maior constituinte com 70% da massa. As bandas a 873 cm^{-1} (vibração provocada para fora do plano do grupo funcional) e a 713 cm^{-1} reforçam esse argumento.

A banda larga, apesar de pouco pronunciada, a 3350 cm^{-1} (múltiplas ligações O-H da forte rede de hidrogénio) e em conjunto com as sobreposições de bandas menos intensas entre os 1000 e 1400 cm^{-1} (diagnóstico para carboidratos por causa das ligações C-O e C-C e das deformações O-H e C-H) são característicos do açúcar, material também incorporado no compósito para a impressão das amostras 1. Na Tabela 3, em anexo, estão discriminadas as posições e intensidades exatas destes máximos.

A similaridade entre os espectros das amostras com e sem fármaco analisadas já era esperada, visto que a massa de antibiótico na solução onde a estrutura foi submersa é muito menor em relação à massa total do *scaffold*, fator importante para a deteção que o equipamento de FTIR utilizado com acoplamento ATR é capaz de realizar.

5.3.2. Análise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 4

De seguida, foram moídas as estruturas com e sem antibiótico baseadas na matriz catalogada como número 4, destacando a presença de metilcelulose, alginato de sódio e a utilização de água, certamente já ausente por desidratação. Os espectros característicos estão representados, na Figura 5.13, pela cor preta e vermelha, respetivamente.

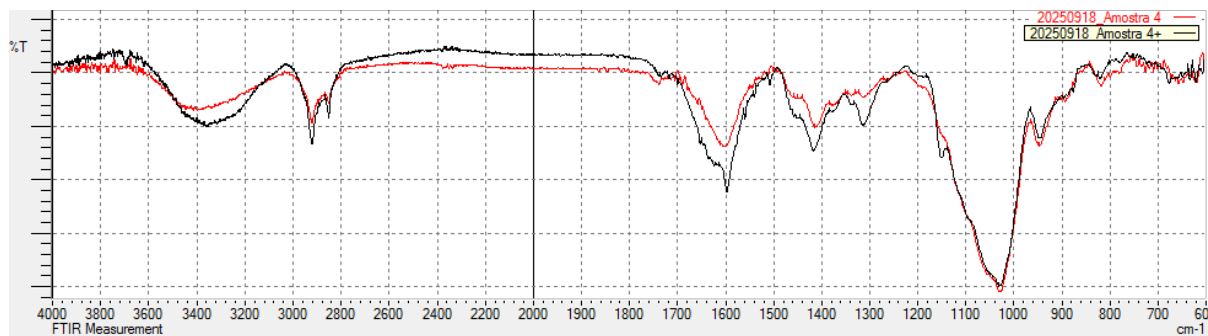


Figura 5.13 - Espectro FTIR do *scaffold* de compósito 4

A banda vibracional mais evidenciada situa-se nos 1028 cm^{-1} , indicando a presença de muitas ligações C-O da metilcelulose e do próprio alginato. As ligações glicosídicas (C-O-C) são uma prevalência dada a matriz utilizada. A banda menos pronunciada, mas visível, com o valor de 945 cm^{-1} é sinónimo da existência do grupo metoxi da metilcelulose. As bandas com os valores de 1415 e 1603 cm^{-1} são referentes ao grupo carboxilato (COO^-) presente no alginato. As bandas aos 2853 e 2922 cm^{-1} são características das ligações C-H das cadeias alifáticas, isto é, dos hidrocarbonetos não aromáticos. A larga lombra visível a 3400 cm^{-1} e a pouca intensidade reflete a quantidade de água que se mantém retida no biofilme.

No espectro desenhado a preto, teoricamente dopado com a sulfanilamida, destacam-se bandas mais intensas a 1150 cm^{-1} (S=O e C-N), a 1315 e 1419 cm^{-1} (S=O), a 1597 e 1653 cm^{-1} (C=C aromática). Numa primeira abordagem, isto poderá significar o sucesso da incorporação do fármaco na estrutura pelo método de absorção.

5.3.3. Análise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 12

A amostra 12, impressa com um compósito formado pelos materiais alginato de sódio, quitosano, *kaolin* (3%) e água, além da reticulação final em cloreto de cálcio. O espectro da Figura 5.14 caracteriza as estruturas com e sem fármaco (cor preta e vermelha, respetivamente).

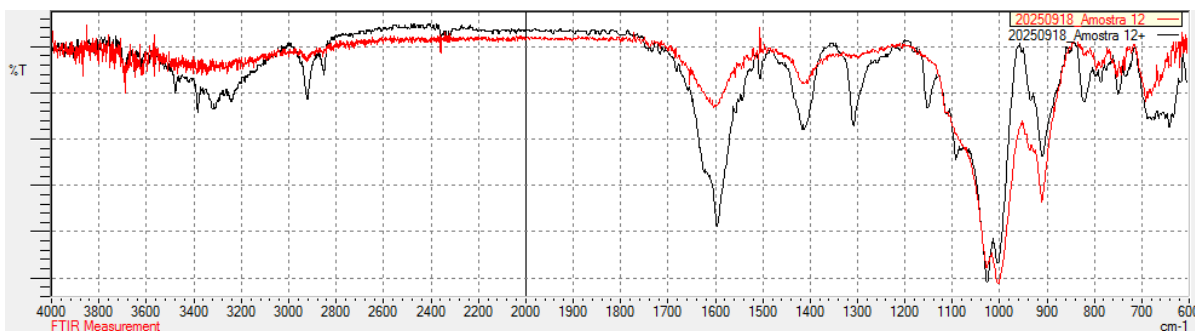


Figura 5.14 - Espectro FTIR do *scaffold* de compósito 12

Começando pelas bandas mais intensas, a 1027 cm^{-1} e a 1003 cm^{-1} estamos perante a confirmação das ligações glicosídicas C-O-C e das ligações Si-O do *kaolin*, respetivamente. Relativamente aos picos a 1406 cm^{-1} e 1609 cm^{-1} , estes são características das ligações COO^- do alginato. Neste espectro a presença do *kaolin* faz-se representar pelas vibrações entre os 600 e os 700 cm^{-1} (Si-O-Al), pelo pico a 910 cm^{-1} (Al-OH). As ligações C-H das cadeias alifáticas traduzem-se nas bandas na ordem dos 2900 cm^{-1} . Por outro lado, as bandas vibracionais que se fazem notar no alombamento entre os 3200 e 3500 cm^{-1} são provocadas pela incorporação do quitosano. Algo impercetível devido à razão sinal/ruído, a banda com a vibração de 3700 cm^{-1} corrobora a existência, em pouca quantidade, do *kaolin* (ligação Al-OH).

As diferenças para o espectro que representa a estrutura exposta à solução com o fármaco são claras, nomeadamente a força acrescida das bandas a 1596 e 1623 cm^{-1} , características da ligação C=C da sulfanilamida. Ao longo de todo o restante espectro, são visíveis mais alterações vibracionais, como as bandas a 1309 cm^{-1} (S=O), ou a 1092 e 1152 cm^{-1} (S=O e C-N).

5.3.4. Análise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 16

Os *scaffolds* constituídos pela mistura número 16 (hidroxiapatite e alginato dissolvidos em água), quando analisados por FTIR com a técnica de ATR, mostram os espectros da Figura 5.15, onde o preto representa a estrutura com fármaco e o vermelho a estrutura sem fármaco.

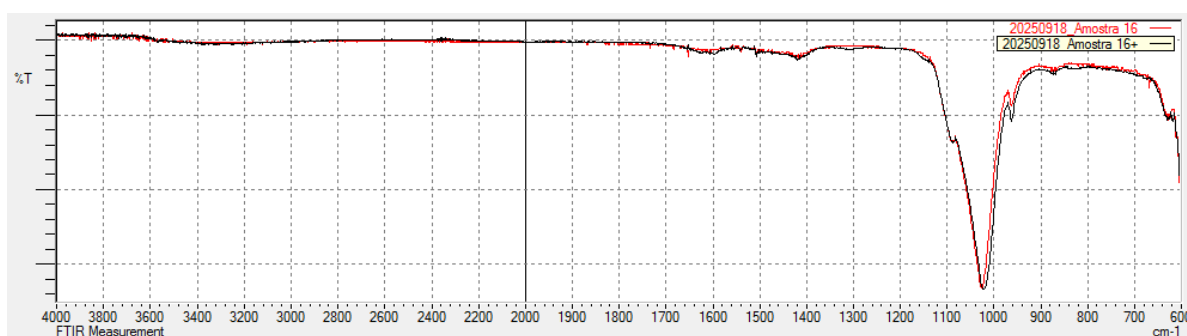


Figura 5.15 - Espectro FTIR do *scaffold* de compósito 16

Observando estes espectros, a banda vibracional a 1026 cm^{-1} destaca-se de forma evidente. Este representa sobretudo as vibrações da ligação P-O, a mais forte do material principal nestes *scaffolds*, a hidroxiapatite. Também o pico a 627 cm^{-1} é um manifesto dessa mesma ligação. A pequena banda a 1427 cm^{-1} é sinal do *stretching* da ligação CO_3^{2-} , igualmente referente à hidroxiapatite. Como o alginato está em muito baixa quantidade nestas estruturas, a banda larga acima dos 3000 cm^{-1} e as suas bandas características a rondar os 1450 e 1700 cm^{-1} não se fazem mostrar.

Através desta análise não é claro que tenha existido a absorção da solução de sulfanilamida, tendo em conta a sobreposição praticamente perfeitas entre os dois espectros que representam as estruturas com e sem fármaco.

5.3.5. Análise FTIR realizada às amostras com e sem antibiótico do compósito 20

Já sobre os seguintes espectros das amostras 20 (Figura 5.16), deduz-se que serão identificáveis os *fingerprint's* da hidroxiapatite e do açúcar, em maior quantidade que o alginato de sódio e a água já ausente por desidratação das estruturas.

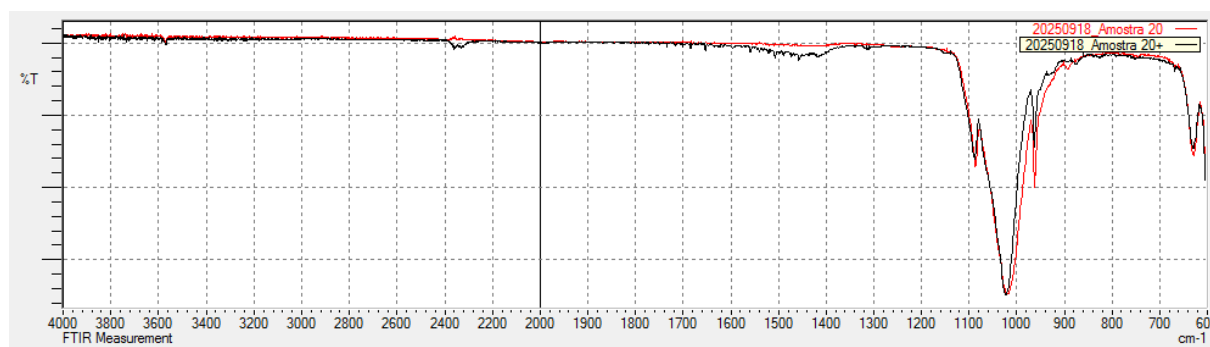


Figura 5.16 - Espectro FTIR do *scaffold* de compósito 20

A hidroxiapatite tem como principal banda vibracional característica aquela que representa a ligação P-O dentro do grupo PO_4^{3-} , a 1019 cm^{-1} neste espectro. Já a 963 e 1087 cm^{-1} registam-se dois picos que correspondem a vibrações secundárias desse tipo de ligação. A frequências mais baixas, as bandas de 600 e 629 cm^{-1} demonstram a deformação do grupo PO_4^{3-} . As bandas O-H que seriam espectáveis devido à presença do açúcar não se visualizam, enquanto as interações com as ligações C-O poderão estar sobrepostas às da hidroxiapatite.

Este caso é idêntico ao dos *scaffolds* formados pelo compósito 16, o que significa um resultado inconclusivo sobre a impregnação de sulfanilamida na estrutura.

6. Conclusões

O presente trabalho de investigação debruçou-se sobre a investigação e sobre o progresso da impressão 3D. Esta tecnologia é cada vez mais uma solução na área da saúde, como é o caso da criação de *scaffolds* biocompatíveis capazes de incorporar e libertar compostos bioativos, no caso deste estudo a sulfanilamida, um antibiótico de origem sintética já descoberto no início do século XIX.

O principal objetivo consistiu no desenvolvimento de estruturas camada a camada com que tivessem uma combinação de propriedades físicas, químicas e biológicas adequadas à finalidade pretendida. A utilização de diferentes materiais, nomeadamente a hidroxiapatite, o alginato de sódio, o açúcar, o quitosano e o *kaolin*, em quantidades e proporções ajustadas são parte importante da otimização para alcançar a estabilidade estrutural e a capacidade de impressão do compósito.

Para o capítulo da impressão 3D, os *scaffolds* com melhor definição e compromisso estrutural são aqueles formados pelo compósito cuja constituição, relativamente às massas percentuais, tem 37,5% de hidroxiapatite, 38% de açúcar, 0,5% de alginato de sódio e 24% de água. A elaboração da catalogação das diversas impressões possibilitou uma organização sistemática dos vários exemplares, organizando-os de acordo com o compósito com que foram desenhados. Este sistema levou a uma perceção mais rápida ao colocar as estruturas em forma de exposição, permitindo analisar à primeira vista quais aquelas com maior potencial para a incorporação de fármacos.

A impregnação com sulfanilamida por método de absorção demonstrou que determinados *scaffolds* foram capazes de efetuar uma libertação do antibiótico no meio, inibindo assim a proliferação de bactérias *S. aureus* (gram-positiva), em ensaios com os compósitos metilcelulose, HA-Alg e HA-sacarose dopados, e de bactérias *E. coli* (gram-negativas), em ensaios com os compósitos HA-Alg e HA-sacarose dopados. Este resultado evidencia o potencial de estruturas com estas características, nomeadamente o uso da metilcelulose, alginato de sódio e hidroxiapatite, para aplicações biomédicas direcionadas à libertação de fármaco e combate a infeções.

A análise microscópica SEM revelou as diferenças na morfologia e homogeneidade das superfícies, enquanto a análise EDS revelou, num dos casos, a díspar composição química em algumas das zonas. Por sua vez, a análise FTIR confirmou a composição das matrizes e dos grupos funcionais, além de verificar alterações aquando da incorporação da sulfanilamida, fazendo-se notar, em particular, para os *scaffolds* dos compósitos metilcelulose e Alg-*kaolin*.

Este conjunto de testes/ensaios possibilitou avaliar a sucesso da dopagem tendo em conta a bioatividade, a composição, a técnica de impressão e a estrutura dos *scaffolds* selecionados.

O estudo mostra assim a viabilidade da impressão 3D como método para personalização de terapias, controlando os materiais de acordo com as propriedades mais desejadas para os *scaffolds* e para a libertação do fármaco. Contudo, foram identificadas limitações, nomeadamente ao nível do tratamento pós-impressão e em termos de reprodutibilidade associada à desidratação das estruturas.

Em síntese, esta dissertação contribuiu para demonstrar a capacidade de criar estruturas com um bom nível de detalhe, utilizando diversos materiais biocompatíveis e com propriedades inibidoras, mostrando o poder da reticulação e verificando a possibilidade da incorporação de substâncias por método de absorção.

7. Perspetivas futuras

Na possibilidade da continuação deste estudo e do seu conteúdo vir a ser alvo de uma futura investigação, existem, pelo menos, três vertentes a partir das quais se poderão prosseguir com vista a novas abordagens: o momento da dopagem, o processo pós-impressão e o antibiótico utilizado.

Num primeiro ponto, a impregnação do antibiótico antes mesmo da impressão da pasta é uma solução a ser analisada. Desta forma haverá, com certeza, um maior êxito na introdução de maiores concentrações de fármaco, mas, eventualmente, provocará determinadas alterações ao nível da consistência, viscosidade e propriedades mecânicas do composto. A capacidade de extrusão, bem como o compromisso com a forma pretendida, sofrerão alterações com esta opção.

Outro aspeto que pode ser alvo de mudança numa posterior abordagem é o modo de desidratação e reticulação dos *scaffolds* impressos. Trata-se de um procedimento fundamental no tratamento pós-impressão e que é responsável por conferir importantes propriedades de rigidez, de estrutura interna/externa e até mesmo químicas como a solubilidade ou a permeabilidade.

Por fim, a utilização de antibióticos de gerações atuais, embora tenha a contrapartida de serem mais dispendiosos, é capaz de proporcionar conclusões mais importantes para os desafios que, por exemplo, a farmacologia enfrenta nos dias que correm. Relativamente a este ponto, a também realização de ensaios biológicos mais diversificados, isto é, com outras bactérias e estirpes, permitirá avaliar o impacto da matriz nesses outros casos.

Ensaio de libertação controlada, como o de UV-VIS, trará mais esclarecimentos sobre a impregnação e o impacto do design estrutural, de modo a validar plenamente a aplicabilidade destes *scaffolds* em medicina personalizada.

8. Referências Bibliográficas

- [1] Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. R., (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials science*, 6(5), 915–946. <https://doi.org/10.1039/c7bm00765e>
- [2] Bogala, M. R. (2022). Three-dimensional (3D) printing of hydroxyapatite-based scaffolds: A review. *Bioprinting* 28. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00244>
- [3] Anas Essop. (2019, August 9). *The Free Beginner's Guide - 3D Printing Industry*. 3D Printing Industry. <https://3dprintingindustry.com/3d-printing-basics-free-beginners-guide>
- [4] Tappa, K., & Jammalamadaka, U. (2018). Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques. *Journal of functional biomaterials*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.3390/jfb9010017>
- [5] Sachdev, A., 4th, Acharya, S., Gadodia, T., Shukla, S., J, H., Akre, C., Khare, M., & Huse, S. (2022). A Review on Techniques and Biomaterials Used in 3D Bioprinting. *Cureus*, 14(8). <https://doi.org/10.7759/cureus.28463>
- [6] Pagnotta, G., Kalia S., Di Lisa, L., F.G. Cicero, A., Borghi, C., Focarete, M.L. (2022). Progress towards 3D bioprinting of tissue models for advanced drug screening: In vitro evaluation of drug toxicity and drug metabolism. *Bioprinting*, Volume 27. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00218>
- [7] Ait Said, H., Mabroum, H., Lahcini, M., Oudadesse, H., Barroug, A., Ben Youcef, H., & Noukrati, H. (2023). Manufacturing methods, properties, and potential applications in bone tissue regeneration of hydroxyapatite-chitosan biocomposites: A review. *International journal of biological macromolecules*, 243, 125150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125150>
- [8] Sauerwein, M., Doubrovski E.L. (2018). Local and Recyclable Materials for Additive Manufacturing: 3D Printing with Mussel Shells. *Materials Today Communications*, S2352-4928(17)30104-6. <https://doi.org/doi:10.1016/j.mtcomm.2018.02.028>
- [9] Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>

- [10] Markl, D., & Zeitler, J. A. (2017). A Review of Disintegration Mechanisms and Measurement Techniques. *Pharmaceutical research*, 34(5), 890–917. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2129-z>
- [11] Rimann, M., Bono, E., Annaheim, H., Bleisch, M., & Graf-Hausner, U. (2016). Standardized 3D Bioprinting of Soft Tissue Models with Human Primary Cells. *Journal of laboratory automation*, 21(4), 496–509. <https://doi.org/10.1177/2211068214567146>
- [12] Ting, H., Chunquan, F., Min, Z., Yufang, Z., Weizhong, Z., Lei, L. (2019). 3D-printed scaffolds of biom mineralized hydroxyapatite nanocomposite on silk fibroin for improving bone regeneration. *Applied Surface Science*, 467-468, 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.10.166>
- [13] Koski, C., Onuiké, B., Bandyopadhyay, A., Bose, S. (2018). Starch-hydroxyapatite composite bone scaffold fabrication utilizing a slurry extrusion-based solid freeform fabricator, 24, 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2018.08.030>
- [14] Melocchi, A., Uboldi, M., Briatico-Vangosa, F., Moutaharrik, S., Cerea, M., Foppoli, A., Maroni, A., Palugan, L., Zema, L., & Gazzaniga, A. (2021). The Chronotopic™ System for Pulsatile and Colonic Delivery of Active Molecules in the Era of Precision Medicine: Feasibility by 3D Printing via Fused Deposition Modeling (FDM). *Pharmaceutics*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050759>
- [15] Nie, L., Deng, Y., Zhang, Y., Zhou, Q., Shi, Q., Zhong, S., Sun, Y., Yang, Z., Sun, M., Politis, C., & Shavandi, A. (2021). Silver-doped biphasic calcium phosphate/alginate microclusters with antibacterial property and controlled doxorubicin delivery. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(19). <https://doi.org/10.1002/app.50433>
- [16] Vieira A.P., Oliveira A. F., Silveira C.B., Gomes A. F. I. (2024). Efeito da reticulação no desenvolvimento e caracterização de biofilmes com alginato de sódio e alginato de sódio contendo carvão ativado. Projeto “Avaliação do efeito da adição de diferentes aditivos nas propriedades mecânicas, térmicas e morfológicas de biomateriais obtidos a partir de alginato de sódio”. Universidade do Estado de Santa Catarina. <https://www.udesc.br>
- [17] Du, X., Fu, S., & Zhu, Y. (2018). 3D printing of ceramic-based scaffolds for bone tissue engineering: an overview. *Journal of materials chemistry. B*, 6(27), 4397–4412. <https://doi.org/10.1039/c8tb00677f>
- [18] Índice Toda a Saúde. Sulfanilamida. Medicamentos, Princípios ativos. <https://www.indices.eu/pt/medicamentos/DCI/sulfanilamida/informacao-geral>

- [19] Bastos, A. R., da Silva, L. P., Maia, F. R., Franco, A., Noro, J., Silva, C., Oliveira, J. M., Reis, R. L., & Correlo, V. M. (2024). Hydroxyapatite/alginate/gellan gum inks with osteoconduction and osteogenic potential for bioprinting bone tissue analogues. *International journal of biological macromolecules*, 271(Pt 2), 132611. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132611>
- [20] Bhattacharyya, A., Ham, H. W., Sonh, J., Gunbayar, M., Jeffy, R., Nagarajan, R., Khatun, M. R., & Noh, I. (2023). 3D bioprinting of complex tissue scaffolds with in situ homogeneously mixed alginate-chitosan-kaolin bioink using advanced portable biopen. *Carbohydrate polymers*, 317, 121046. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121046>
- [21] De Cataldo, A., & Gentile, L. (2024). Methylcellulose as a non-bonding gelling agent for calcium chloride methanol fuel gels. *Carbohydrate polymers*, 323, 121413. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121413>
- [22] Álcool de Polivinil: Propriedades, usos e aplicações. Home Healthcare. Abril de 2021. <https://homehealthcarereport.com/pt/Álcool-de-polivinil-propriedades-usos-e-aplicações/#:~:text=Uma%20vez%20que%20o%20álcool%20polivinílico>
- [23] Mohammed A., Abdullah A. (2019). Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics – HERVEX. https://www.researchgate.net/publication/330168803_Scanning_Electron_Microscopy_SEM_A_Review
- [24] J. Webb, J.H. Holgate (2003). Scanning Electron Microscope. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition).
- [25] Sizar O, Leslie SW, Unakal CG. Gram-Positive Bacteria. [Updated 2023 May 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/>
- [26] Tripathi, N., Zubair, M., & Sapra, A. (2025). Gram Staining. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- [27] Team, T. (2024, December 24). *Sputter Coater for SEM: Important Insights You Must Know* | Torontech. Torontech. <https://torontech.com/sputter-coater-for-sem/>.

9. Anexos



Figura 9.1 - Seringa utilizada como reservatório e utensílio de impressão

Tabela 9.1 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 1

Banda (cm ⁻¹)	Intensidade	Intensidade Corr.	Base (alta)	Base (baixa)	Área	Área Corr.
712,71	69,02	27,82 Div	724,28	699,21	352,959	273,744 Div
847,73	82,47	14,40 Div	853,52	818,80	351,532	242,690 Div
872,80	54,18	42,70 Div	890,16	853,52	933,402	818,768 Div
909,45	86,00	10,87 Div	913,31	892,09	191,404	125,164 Div
921,03	88,28	1,59	932,60	918,13	131,128	3,239
943,21	90,61	2,83	953,82	932,60	162,312	23,008
990,46	79,78	17,11 Div	998,18	958,64	472,448	349,583 Div
1004,93	83,82	13,08 Div	1008,79	998,18	160,043	127,131 Div
1013,61	84,22	12,68 Div	1023,25	1008,79	204,859	160,014 Div
1037,72	82,09	0,87	1039,65	1023,25	237,585	-3,430
1053,15	79,11	17,80 Div	1059,90	1039,65	393,044	330,394 Div
1067,62	77,34	19,57 Div	1095,59	1059,90	595,741	485,552 Div
1105,23	86,44	10,48 Div	1110,05	1095,59	178,655	134,054 Div
1115,84	85,89	11,03 Div	1121,63	1110,05	154,701	119,050 Div
1129,34	86,33	1,85	1150,56	1121,63	335,768	27,102
1208,42	89,02	7,92 Div	1215,17	1191,06	235,501	161,636 Div
1238,32	86,47	0,15	1239,29	1215,17	283,764	-0,353
1394,56	50,61	46,37 Div	1397,45	1388,77	422,583	396,312 Div

Tabela 9.2 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 4

Banda (cm ⁻¹)	Intensidade	Intensidade Corr.	Base (alta)	Base (baixa)	Área	Área Corr.
818,80	98,65	0,98	841,94	811,08	15,923	14,670
893,06	97,23	0,69	898,84	877,63	47,654	9,067
945,14	93,23	0,14	946,10	913,31	155,934	3,408
1028,08	79,98	19,36 Div	1044,47	965,39	1101,219	1050,596 Div
1265,32	99,14	0,36	1273,04	1250,86	13,986	3,868
1314,51	97,59	0,68	1323,19	1273,04	83,503	19,218
1337,66	97,79	0,22	1345,37	1329,94	32,203	1,613
1378,16	96,86	0,41	1384,91	1350,19	92,406	8,112
1414,81	94,99	0,14	1440,85	1413,85	99,934	0,222
1452,42	97,53	0,08	1458,21	1450,49	18,638	0,443
1602,87	93,13	0,91	1610,59	1550,79	273,041	31,114
2852,77	97,10	1,44 Div	2866,27	2814,19	88,690	13,030 Div
2922,21	95,34	3,17 Div	2975,25	2897,13	219,546	102,737 Div

Tabela 9.3 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 12

Banda (cm ⁻¹)	Intensidade	Intensidade Corr.	Base (alta)	Base (baixa)	Área	Área Corr.
691,49	97,05	0,51	698,24	689,56	21,364	1,929
743,57	98,49	0,68	747,43	738,75	9,538	2,476
796,61	98,73	0,55	801,44	792,76	8,281	2,201
910,42	91,62	3,44	923,92	885,34	239,408	62,025
1003,00	87,19	2,97	1015,54	952,85	565,220	82,041
1027,11	88,07	1,90	1066,65	1015,54	469,010	31,195
1406,13	98,00	0,10	1407,10	1397,45	16,755	0,335
1608,66	96,88	0,09	1611,55	1607,70	11,793	0,253

Tabela 9.4 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 16

Banda (cm ⁻¹)	Intensidade	Intensidade Corr.	Base (alta)	Base (baixa)	Área	Área Corr.
626,88	82,62	0,63	627,84	624,95	49,564	1,117
873,77	93,56	0,23	875,70	870,88	30,366	0,513
962,50	85,53	4,20	971,18	936,46	364,832	47,128
1026,15	45,21	38,38	1083,05	971,18	3773,592	1927,819
1088,84	77,69	2,61	1137,06	1083,05	730,607	42,684
1416,74	96,61	0,08	1417,70	1412,88	15,797	0,119

Tabela 9.5 - Espectro de FTIR da amostra do compósito 20

Banda (cm ⁻¹)	Intensidade	Intensidade Corr.	Base (alta)	Base (baixa)	Área	Área Corr.
628,80	59,11	27,75 Div	660,63	614,34	1143,846	536,436 Div
892,09	90,54	-3,04 Div	901,74	879,56	180,687	-96,705 Div
962,50	47,68	39,99 Div	969,25	901,74	1361,612	524,740 Div
1019,40	9,06	78,74 Div	1078,23	969,25	6791,675	5464,116 Div
1086,91	55,11	17,05	1146,70	1078,23	1236,136	55,180

Tabela 9.6 - EDS referente à região 1 da amostra do compósito 16

Número do elem.	Símbolo do elem.	Nome do elemento	Concentra. atômica [%]	Concentra. massa [%]
6	C	Carbono	1.90	0.70
8	O	Oxigênio	12.83	6.31
11	Na	Sódio	31.44	22.22
13	Al	Alumínio	6.76	5.61
14	Si	Silício	7.77	6.71
17	Cl	Cloro	33.62	36.64
20	Ca	Cálcio	2.60	3.20
79	Au	Ouro	3.07	18.62

Tabela 9.7 - EDS referente à região 2 da amostra do compósito 16

Número do elem.	Símbolo do elem.	Nome do elemento	Concentra. atômica [%]	Concentra. massa [%]
6	C	Carbono	7.37	3.10
8	O	Oxigênio	33.00	18.48
13	Al	Alumínio	24.13	22.78
14	Si	Silício	25.40	24.98
17	Cl	Cloro	1.77	2.20
19	K	Potássio	2.77	3.80
20	Ca	Cálcio	1.85	2.60
46	Pd	Paládio	1.10	4.10
79	Au	Ouro	2.61	17.98