

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# BIOPOLÍMEROS PARA OTIMIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Rachel Silva Cordeiro

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, ramo Controlo da Qualidade e Ambiente, orientada pelo Professor Doutor Filipe João Cotovio Eufrásio Antunes, Professora Doutora Marta Helena Fernandes Henriques e Professora Doutora Carla Sofia Monteiro de Moura, e apresentada ao Departamento de Química, na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



# Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao meu orientador interno, o Professor Filipe Antunes, por toda a confiança que depositou em mim, por me ter acompanhado e, para além de me transmitir novos conhecimentos, me ter auxiliado e integrado em novas equipas, abrindo horizontes para mais conhecimento científico.

Agradeço também às minhas orientadoras externas, a Professora Carla Moura e a Professora Marta Henriques, pela generosidade em me terem recebido nas suas equipas no CDRSP (Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto) e na ESAC (Escola Superior Agraria de Coimbra). Gratifico por toda a disponibilidade, por todas as horas de *brainstorming* que tivemos, por me acompanharem em mais uma etapa, encorajando-me em todas as situações, e principalmente por ter construído amizades para além do projeto.

Seguidamente, agradeço também a todos os colegas que conheci durante este ano. Com eles foi possível adquirir novos conhecimentos e certamente criar amizades para a vida. Assim, agradeço especialmente à Cristiana Fernandes e à Daniela Trindade por se terem tornado essenciais nesta caminhada, sem elas teria sido mais difícil, ficando uma amizade.

Um agradecimento muito especial à minha irmã, por ter estado sempre ao meu lado, dando força para nunca desistir. Sem o apoio dela teria sido impossível alcançar esta etapa.

Por último, aos meus pais, pelo apoio incondicional que me têm prestado ao longo da vida e em todas as minhas escolhas. Agradeço-lhe pelo esforço que fazem para que possa ser cada dia uma pessoa melhor, mais forte e mais feliz.



“What is essential is invisible to the eye. It is only with the heart  
that one can see rightly” **Antoine de Saint-Exupery**



## Resumo

---

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com a Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC) e a Centro de Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto (CDRSP). O objetivo principal foi encontrar fontes alternativas de celulose, mais sustentáveis e competitivas com a celulose proveniente da madeira. Este polímero foi combinado com policaprolactona (PCL) para produzir estruturas tridimensionais.

As fontes selecionadas para a extração e purificação da celulose foram: carolo de milho, engaço de uva, folha de espiga de milho, casca de romã, bagaço de medronho e vagem de fava. O carolo de milho apresentou melhor rendimento de extração ( $26\pm 1,2\%$ ) e maior grau de pureza. Em termos de análise térmica, todas as celuloses são similares à celulose microcristalina (controlo). Deste modo, para a construção de *scaffolds* foi selecionada a celulose de carolo de milho, e como polímero base, utilizou-se a PCL. As concentrações testadas foram 1 e 2% de celulose na mistura final.

Os *scaffolds* produzidos foram caracterizados morfologicamente, apresentando-se todos muito similares, tendo  $300\ \mu\text{m}$  de poro e  $300\ \mu\text{m}$  de filamento. Realizou-se também a sua análise térmica e de compressão, uma vez que o objetivo é a sua aplicação no joelho. Não foram encontradas diferenças significativas entre os *scaffolds* produzidos com celulose microcristalina e a celulose de carolo de milho, logo a celulose resultante do carolo de milho apresenta-se como um bom substituto à celulose convencional, proveniente da madeira. Por fim, realizou-se um teste enzimático com lisozima, demonstrando que ao fim do primeiro mês, os *scaffolds* com 2% de celulose de carolo de milho registaram um ligeiro decréscimo das suas propriedades mecânicas, reflexo da ocorrência de alguma percentagem de degradação.

Em suma, a celulose de carolo de milho apresenta-se como um bom substituto da celulose microcristalina para aplicações biomédicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** agrosíduos, cartilagem, celulose, policaprolactona (PCL), *scaffolds*.



# Abstract

---

This work was developed in partnership between the Coimbra Agriculture College (ESAC) and the Centre for Rapid and Sustainable Product Development (CDRSP). Its main objective is to find alternative sources of cellulose, more sustainable and competitive than wood cellulose. This polymer was combined with polycaprolactone (PCL) to produce three dimensional structures.

The sources selected for cellulose extraction and purification were: corncob, grape stalk, corncob husk, pomegranate peel, strawberry tree fruit and fava pod. Corncob presented a better extraction yield ( $26 \pm 1.2\%$ ) and higher purity. In terms of thermal analysis, all celluloses are similar to microcrystalline cellulose (control). For that reason, the corncob cellulose was selected for the construction of scaffolds and the PCL was used as base polymer. The samples tested were 1 and 2% cellulose in the final mixture.

The scaffolds produced were morphologically characterized. All showed to be quite similar, presenting 300  $\mu\text{m}$  of pore size and 300  $\mu\text{m}$  of filament size. It was also performed thermal and compression analysis, since the aim is to use the implant in the knee. No significant differences were shown between scaffolds, which were produced with microcrystalline cellulose and corncob cellulose, so corncob cellulose can be considered as a good substitute for conventional wood cellulose. Finally, an enzymatic test was performed with lysozyme, showing that at the end of the first month, scaffolds with 2% of corncob cellulose registered a small decreasing of its mechanical properties, reflecting the occurrence of some degradation.

In short, corncob cellulose shows to be a good substitute for microcrystalline cellulose for biomedical applications.

**KEYWORDS:** agroresidues, cartilage, cellulose, polycaprolactone (PCL), scaffolds.



# Índice

---

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CARTILAGEM ARTICULAR .....	2
<i>Condrócitos</i> .....	2
<i>Matriz extracelular</i> .....	3
1.1.1 <i>Arquitetura da cartilagem articular</i> .....	4
1.1.2 <i>Comportamento bifásico</i> .....	5
1.2 LESÕES NA CARTILAGEM ARTICULAR .....	6
1.3 TÉCNICAS PARA REPARAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR .....	7
1.4 ENGENHARIA DE TECIDOS .....	8
1.5 PROPRIEDADES DOS <i>SCAFFOLDS</i> .....	9
1.6 TIPOS DE BIOMATERIAIS USADOS PARA PRODUÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> .....	11
1.7 CELULOSE .....	15
1.8 TÉCNICAS PARA PRODUÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> .....	16
1.9 OBJETIVOS .....	18
<b>CAPÍTULO 2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA CELULOSE .....	19
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE .....	21
2.3 PRODUÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> .....	22
2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i> .....	24
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
<b>CAPÍTULO 3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 EXTRAÇÃO DA CELULOSE DOS VÁRIOS AGRORESÍDUOS .....	28
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE EXTRAÍDA DOS VÁRIOS AGRORESÍDUOS .....	34
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i> .....	40
<b>CAPÍTULO 4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO 5 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>51</b>



# Índice de Figuras

---

<b>FIGURA 1</b> - TIPOS DE CARTILAGEM ENCONTRADOS NO CORPO HUMANO: CARTILAGEM HIALINA OU ARTICULAR (A); CARTILAGEM ELÁSTICA (B); CARTILAGEM FIBROSA (C) (GIORGI 2015).....	2
<b>FIGURA 2</b> - REPRESENTAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR E DAS DIFERENTES ZONAS .....	4
<b>FIGURA 3</b> - EXEMPLOS DE LESÕES DE CARTILAGEM DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DA <i>INTERNATIONAL CARTILAGE REPAIR SOCIETY</i> (ICRS) .....	6
<b>FIGURA 4</b> - ESQUEMATIZAÇÃO DA IMPLEMENTAÇÃO DE UM <i>SCAFFOLD</i> NA CARTILAGEM ARTICULAR: CULTURA CELULAR E APLICAÇÃO DO <i>SCAFFOLD</i> (ADAPTADO DE: MEYER E WIESMANN 2006B; HUANG, HU, E ATHANASIOU 2016).....	9
<b>FIGURA 5</b> - ESTRUTURA DA POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA).....	14
<b>FIGURA 6</b> - ESTRUTURA DA CELULOSE .....	14
<b>FIGURA 7</b> - PRODUÇÃO DE MADEIRA, CORTIÇA E OUTROS BENS (INE, 2017) .....	15
<b>FIGURA 8</b> - PRODUÇÃO DE SERVIÇOS SILVÍCOLAS E FLORESTAÇÃO/REFLORESTAÇÃO (€) (INE, 2017)....	16
<b>FIGURA 9</b> - SISTEMA REAL DE FDM ( <i>FUSED DEPOSITION MODELLING</i> ) (MOROUÇO ET AL. 2016).....	18
<b>FIGURA 10</b> - ESQUEMATIZAÇÃO DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO DA CELULOSE .....	20
<b>FIGURA 11</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM <i>SCAFFOLD</i> COM AS SUAS DIMENSÕES MACRO E MICROSCÓPICAS .....	25
<b>FIGURA 12</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA REALIZADA AOS <i>SCAFFOLDS</i> .....	27
<b>FIGURA 13</b> - QUANTIDADE DE MATERIAL REMOVIDO EM CADA ETAPA DE EXTRAÇÃO, PARA AS DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS .....	29
<b>FIGURA 14</b> - RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO DE CELULOSE PARA CADA MATÉRIA-PRIMA ESTUDADA. FOI REALIZADA UMA ANOVA SIMPLES (N=3). AMOSTRAS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $P<0,01$ (**) E $P<0,001$ (***).....	33
<b>FIGURA 15</b> - IMAGENS A OLHO NU (A, B, C, D, E, F) E MICROSCÓPICAS (AMPLIAÇÃO 20X) (G, H, I, J, K, L) DAS CELULOSES EXTRAÍDAS.....	36
<b>FIGURA 16</b> - ESPECTRO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DAS CELULOSES OBTIDAS. A- BANDA CARACTERÍSTICA DA HEMICELULOSE; B- BANDA CARACTERÍSTICA DA CELULOSE .....	38
<b>FIGURA 17</b> - TERMOGRAMAS OBTIDOS POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO (DSC) DAS AMOSTRAS DE 6 FONTES DE CELULOSE DE AGRORESÍDUOS E DA CELULOSE MICROCRISTALINA (CONTROLO). .....	38
<b>FIGURA 18</b> - <i>SCAFFOLDS</i> DE POLICAPROLACTONA (PCL) PRODUZIDA POR EXTRUSÃO NA BIOEXTRUDER. A) EXEMPLO DE UMA AMOSTRA PRODUZIDA; B) COMPARAÇÃO ENTRE AS DIMENSÕES PROJETADAS E AS DIMENSÕES OBTIDAS. ....	41
<b>FIGURA 19</b> - MORFOLOGIA DAS <i>SCAFFOLDS</i> DE (PCL+ CELULOSE) A OLHO NU, MICROSCOPIA ÓTICA (AMPLIAÇÃO 40X) E MICROTOMOGRAFIA COMPUTORIZADA (MICROCT). .....	42

<b>FIGURA 20</b> - TERMOGRAMAS OBTIDOS POR DSC PARA OS SCAFFOLDS DE PCL E CELULOSE (MICROCRISTALINA E DE CAROLO DE MILHO) (N=3).....	44
<b>FIGURA 21</b> – PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS SCAFFOLDS DE PCL E CELULOSE (MICROCRISTALINA E CAROLO DE MILHO) (N=5): A) CURVAS TENSÃO-EXTENSÃO; B) MÓDULOS DE ELASTICIDADE À COMPRESSÃO. FOI REALIZADA UMA ANOVA SIMPLES (N=5). AMOSTRAS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $P < 0,001$ (***).....	45
<b>FIGURA 22</b> - EVOLUÇÃO DA MASSA DOS SCAFFOLDS EXPOSTOS A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA COM LISOZIMA AOS DIAS 0, 7 E 28 (N=3, POR CONDIÇÃO, POR DIA DE AVALIAÇÃO). .....	46
<b>FIGURA 23</b> – PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS SCAFFOLDS DE PCL E CELULOSE (MICROCRISTALINA E CAROLO DE MILHO) EM ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO COM LISOZIMA (N=3): A) CURVA TENSÃO-EXTENSÃO DE M_1%; B) CURVA TENSÃO-EXTENSÃO M_2%; CURVA TENSÃO-EXTENSÃO CM_1%; CURVA TENSÃO-EXTENSÃO CM_2%; E) MÓDULOS DE ELASTICIDADE À COMPRESSÃO. FOI REALIZADA UMA ANOVA DUPLA (N=5). AMOSTRAS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $P < 0,05$ (*).....	48

# Índice de Tabelas

---

<b>TABELA 1</b> - PRINCIPAIS MATRIZES UTILIZADAS EM ENGENHARIA DE TECIDOS (ET) PARA REGENERAÇÃO DE CARTILAGEM (ADAPTADA DE: ROSENZWEIG ET AL. 2015; VINATIER E GUICHEUX 2016) .....	11
<b>TABELA 2</b> PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A EXTRUSÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FDM .....	24
<b>TABELA 3</b> - ANÁLISE ESTATÍSTICA DE CADA MATÉRIA-PRIMA NAS DIFERENTES ETAPAS DE EXTRAÇÃO. ....	32
<b>TABELA 4</b> – ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO (DSC) PARA AS AMOSTRAS DE 6 FONTES DE CELULOSE DE AGRORESÍDUOS. FOI REALIZADA UMA ANOVA DUPLA (N=3). AMOSTRAS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES PARA $P<0,05$ (*) E $P<0,001$ (***) .....	39
<b>TABELA 5</b> - POROSIDADE DOS <i>SCAFFOLDS</i> DE PCL E CELULOSE, CALCULADA ATRAVÉS DE MICROCT. ....	43



## Índice de abreviaturas

---

**3D** - Três Dimensões

**3DP** - *Three-dimensional printing* (Impressão tri-dimensional)

**AM** - *Additive manufacturing* (Fabricação aditiva)

**DMF** - Dimetilformamida

**DSC** – *Differential scanning calorimetry* (Calorimetria diferencial de varrimento)

**ET** - Engenharia de Tecidos

**FDM** - *Fused deposition modelling* (Modelação por deposição fundida)

**GAGs** - Glicosaminoglicanos

**ICRS** - *International Cartilage Repair Society*

**IV** – Radiação infravermelho

**MEC** - Matriz Extracelular

**OA** - Osteoartrose

**PBS** – *Phosphate-buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

**PCL** - Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

**PGs** - Proteoglicanos

**PLA** - Poli(ácido láctico)

**PLGA** - Poli(ácido láctico-co-glicólico)

**SLA** – *Stereolithography* (Esteriolitografia)

**SLS** - *Selective laser sintering* (Sinterização selectiva por laser)

**TGA** – *Thermogravimetric analysis* (Análise termogravimétrica)

**UV** – Radiação ultravioleta



## Introdução

---

Em 2011 cerca de 2 milhões de portugueses entre os 15 e os 64 anos, apresentaram dificuldades na realização de atividades básicas. Grande parte destas dificuldades devem-se a doenças músculo-esqueléticas, das quais 8,6% manifestam-se nos membros inferiores (INE 2012).

Uma das doenças músculo-esqueléticas mais conhecidas é a artrite reumatoide, que afeta 5 em cada 1000 adultos, maioritariamente mulheres. Esta patologia envolve a inflamação da membrana sinovial, que leva à destruição da cartilagem articular e da camada óssea mais próxima a esta (Aletaha e Smolen 2018; Guo et al. 2018). Para além desta patologia, outros fatores podem levar à destruição da cartilagem articular, onde atualmente a sua reparação passa por técnicas, como a estimulação da medula óssea, implantação celular ou transplantes de células incorporadas em matrizes (Park et al. 2018). Em estados mais avançados, a reparação da cartilagem é praticamente inexistente.

A população adulta apresenta cartilagem na superfície articular dos ossos longos, na traqueia, na laringe, nos brônquios, no nariz e nas orelhas, e ainda entre os discos vertebrais (Meyer e Wiesmann 2006a). A cartilagem é um material biológico elástico e poroso, principalmente constituído por fibras de colagénio e células, no entanto é desprovida de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (Meyer e Wiesmann 2006a; Peterson e Cole 2007; Safari et al. 2019). Existem três tipos de cartilagem, diferindo de acordo com a sua constituição e o local em que se encontram: hialina ou articular, elástica e fibrosa (**Figura 1**). A cartilagem hialina é a mais abundante no corpo humano estando presente nas superfícies articulares dos ossos, nos brônquios, na laringe e na traqueia, e apresenta uma cor branca com aspeto vítreo. A cartilagem elástica está presente essencialmente nas orelhas, nariz e em partes da laringe (Armiento, Alini, e Stoddart 2018). É caracterizada pela presença de elastina e a sua principal função é garantir a permeabilidade das matrizes onde está presente. Por último, a cartilagem fibrosa (fibrocartilagem) encontra-se nos discos vertebrais, na junção dos grandes tendões, e apresenta uma alta concentração de colagénio quando comparada com a cartilagem hialina (Temenoff e Mikos 2000).



**Figura 1** - Tipos de cartilagem encontrados no corpo humano: cartilagem hialina ou articular (A); cartilagem elástica (B); cartilagem fibrosa (C) (Giorgi 2015)

## 1.1 Cartilagem articular

A cartilagem articular ou hialina representa 2% do volume da cartilagem total em humanos adultos (Fahy, Alini, e Stoddart 2017; Meyer e Wiesmann 2006a). Confere resistência à compressão e tem a capacidade de distribuir as cargas exercidas, não podendo ser substituída por nenhum outro tecido (Temenoff e Mikos 2000). É um tecido vivo, avascular e ativo, formado e mantido por condrócitos que estão rodeados por uma matriz extracelular (MEC), que os próprios condrócitos secretam, encontrando-se alojados nos espaços desta matriz (Armiento et al. 2018; Landínez-Parra, Nancy S. e Vanegas-Acosta 2012).

### **Condrócitos**

Os condrócitos são as únicas células presentes na cartilagem articular e representam cerca de 1% do seu volume. São originárias das células mesenquimais, que se encontram na medula óssea de um indivíduo. Durante o desenvolvimento do embrião, as células mesenquimais diferenciam-se em condrócitos, responsáveis pela produção da MEC. A sua interação resulta numa estrutura com características únicas e complexas, apesar das suas dimensões reduzidas (Temenoff e Mikos 2000). Assim, os condrócitos sintetizam proteínas e proteoglicanos (PGs) para a MEC, enquanto esta regula o metabolismo dos condrócitos (Lapadula et al. 1998). A principal função destas células é manter a MEC, suportar as cargas mecânicas e regenerar lesões na cartilagem. São células altamente hidratadas que, quando combinadas com os PGs, formam um gel. Não existe ainda uma justificação consensual sobre como os condrócitos obtêm nutrientes, porém alguns autores defendem que o mais provável será através do contacto com o osso vascularizado, manifestando-se crucial para a sobrevivência dos condrócitos (Peterson e Cole 2007).

### **Matriz extracelular**

A matriz extracelular (MEC), é composta por lípidos, fosfolípidos, glicoproteínas, proteoglicanos, colagénio e fluido do tecido. É responsável pelas propriedades mecânicas da cartilagem.

Os PGs representam cerca de 3% do peso da cartilagem articular e são produzidos pelos condrócitos, como mencionado anteriormente. São compostos por 95% de polissacarídeos e 5% de proteínas (Temenoff e Mikos 2000). Estas macromoléculas têm uma vida útil de 3 meses e são responsáveis pela porosidade da cartilagem, auxiliando também na resistência à compressão. São compostas por unidades de glicosaminoglicanos (GAGs) que facilitam a interação com a água, conferindo elasticidade ao tecido, ao mesmo tempo que repelem aniões. Exemplos de GAGs encontrados na cartilagem articular são: o sulfato de condroitina, o sulfato de queratina, o sulfato de dermatano e o ácido hialurónico (Knudson et al. 2018; Landínez-Parra, Nancy S. e Vanegas-Acosta 2012). Existe maior concentração de PGs na zona intermédia e na zona profunda da cartilagem (Schumacher et al. 1994).

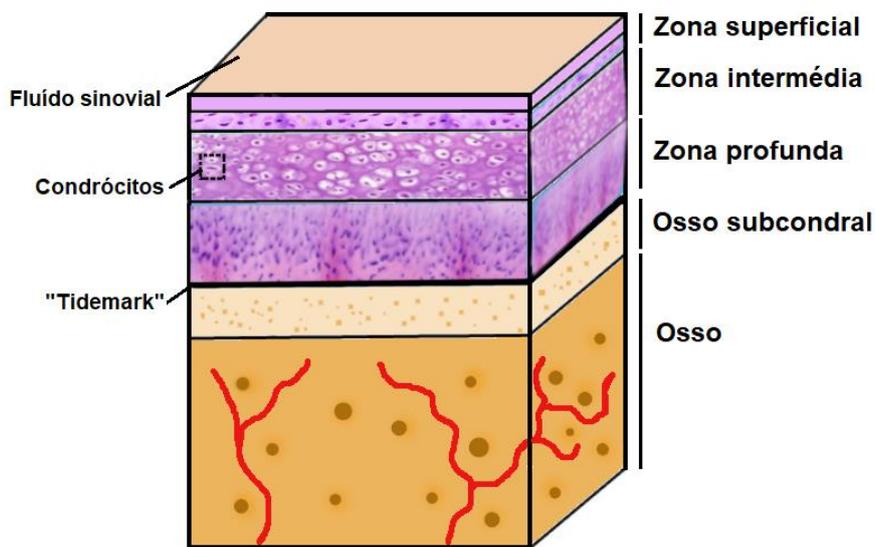
As glicoproteínas são uma pequena quantidade de oligossacarídeos associados a núcleos proteicos, e a sua principal função é ajudar na estabilização da matriz, enquanto auxilia nas interações existentes entre a matriz e os condrócitos. A glicoproteína mais importante é a integrina, uma vez que interage com as células recetoras e regula a migração, proliferação e diferenciação dos condrócitos (Landínez-Parra, Nancy S. e Vanegas-Acosta 2012).

O colagénio representa cerca de 16% do peso da cartilagem articular (Muir 1995), existindo 5 tipos diferentes: II, VI, IX, X e XI. O colagénio tipo II representa 90-95% do colagénio da matriz e permite maior interação com a água, pois estabelece ligações a grupos de carboidratos. O colagénio do tipo IX e XI formam fibrilas que, ao se entrelaçarem, constroem uma malha capaz de suportar forças de tensão, mas que não oferece grande resistência a forças de compressão (Cohen, Mow, e Foster 1998).

O fluido do tecido é uma parte essencial para a cartilagem hialina, correspondendo a 80% do peso do tecido. Este líquido contém água, gases, metabolitos e catiões. As trocas entre este fluido e o fluido sinovial providenciam nutrientes e oxigénio para a cartilagem, ao mesmo tempo que confere resistência à compressão e capacidade de voltar à forma original após deformação (Temenoff e Mikos 2000). A quantidade de água presente na cartilagem define se esta irá assumir uma consistência mais ou menos elástica (Landínez-Parra, Nancy S. e Vanegas-Acosta 2012).

### 1.1.1 Arquitetura da cartilagem articular

A cartilagem é um tecido estratificado em zonas, em que cada uma apresenta diferentes espessuras e fibras irregulares. Há alguma discordância em relação ao número de zonas que constituem a cartilagem, havendo autores que defendem a estratificação em 3 zonas (Xia, Darling, e Herzog 2018) e outros em 4 zonas (Baumann et al. 2019). No presente trabalho foram consideradas 4 zonas, dividindo-se em: zona superficial, zona intermédia ou de transição, zona profunda e zona calcificada, como exemplificado na **Figura 2** (Bullough e Jagannath 1983; Farokhi et al. 2019; Redler et al. 1975; Temenoff e Mikos 2000).



**Figura 2** - Representação da cartilagem articular e das diferentes zonas

- **Zona superficial**

Esta zona divide-se em 2 camadas: a mais superficial composta predominantemente por colagénio e a camada sob esta que apresenta condrócitos. Esta zona representa cerca de 10-20% da espessura total da cartilagem articular, conferindo resistência ao cisalhamento aquando do movimento da articulação, não provocando qualquer tipo de atrito na sua superfície. É rica em colagénio e as suas fibras estão organizadas de forma compacta (Rawal et al. 2013; Temenoff e Mikos 2000). Os condrócitos apresentam uma forma elíptica e estão orientados paralelamente à superfície, apresentando baixa atividade e pouca síntese proteica (Landínez-Parra, Nancy S. e Vanegas-Acosta 2012).

- **Zona intermédia**

É uma zona maior que a anterior, representando 40% do volume da cartilagem, e também é composta por condrócitos. Contudo, estes apresentam uma forma arredondada e têm uma distribuição aleatória (Farokhi et al. 2019). Nesta zona está presente uma grande quantidade de PGs e uma baixa percentagem de colagénio, no

entanto com fibras de maior espessura, igualmente distribuídas aleatoriamente. Esta zona tem uma taxa metabólica elevada e suporta grande parte das forças de compressão (Landínez-Parra, Nancy S. e Vanegas-Acosta 2012; Peterson e Cole 2007).

- **Zona profunda**

A zona profunda representa cerca de 30% da cartilagem e incorpora condrócitos de forma arredondada e fibras de colagénio de grande diâmetro, semelhante à zona intermédia (Rawal et al. 2013). No entanto, os condrócitos e as fibras de colagénio estão dispostos de forma perpendicular à superfície formando colunas. Esta zona apresenta uma alta taxa de síntese proteica, menor quantidade de água que as zonas anteriores, mas grande abundância de PGs (Landínez-Parra, Nancy S. e Vanegas-Acosta 2012).

- **Zona calcificada**

A zona calcificada é a que fica mais próxima do osso, sendo separada da zona anterior por uma linha denominada “*tidemark*”. Esta linha é ondulada e tangencial à zona profunda, tendo a capacidade de suportar as forças de cisalhamento. Dado que é a zona de transição da cartilagem para o osso, é onde se exerce mais força de atrito através das tensões de corte provocadas pela superfície rígida do osso (Temenoff e Mikos 2000). As células são escassas e de pequenas dimensões, enquanto a matriz é rica em cristais de hidroxiapatite (Landínez-Parra, Nancy S. e Vanegas-Acosta 2012).

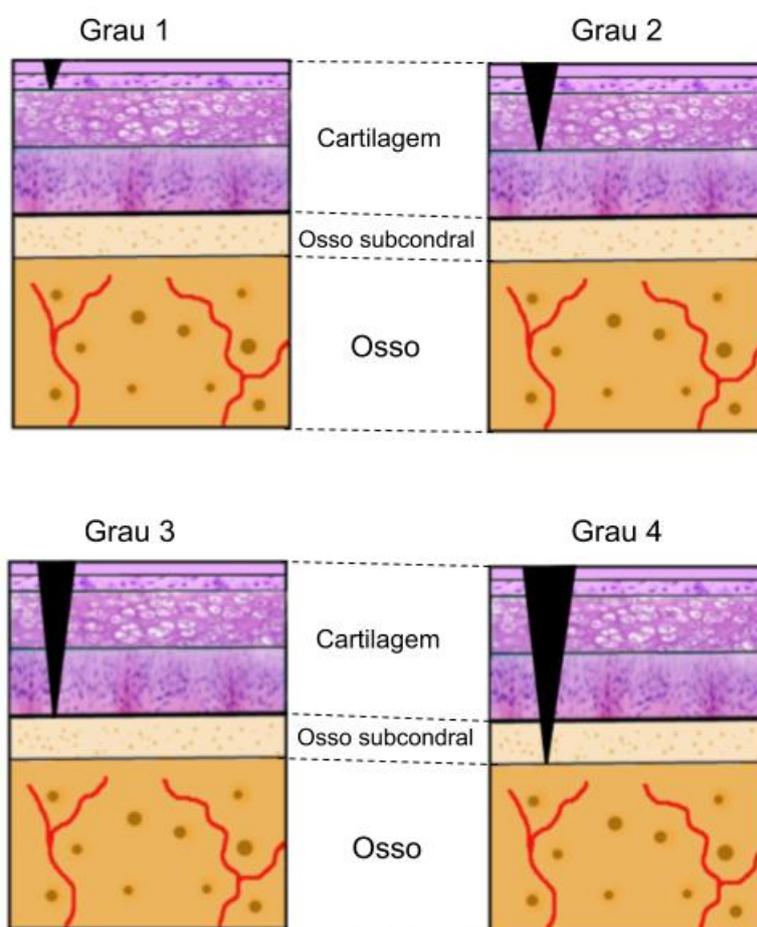
### 1.1.2 Comportamento bifásico

A natureza bifásica com que a cartilagem articular se apresenta é essencial para a o suporte das cargas, que por vezes são bastante elevadas. Segundo estudos de Shepherd (1999), o módulo de compressão da cartilagem articular do joelho humano varia entre 5,5 e 11,8 MPa.

Em termos de propriedades físico-químicas, a resistência às cargas existe quando uma pressão é exercida na cartilagem e esta, por sua vez, atua de forma a que a água e os iões fluam através dos poros da matriz sólida, criando forças de atrito pelo seu arrasto. Esta força resultante da transferência de cargas entre a fase sólida e líquida desperta as propriedades mecânicas que, por sua vez, proporcionam capacidade predominantemente viscoelástica capaz de suportar a carga. Para suportar esta carga externa existem 3 forças que atuam internamente: a pressão desenvolvida dentro da fase sólida, a pressão desenvolvida dentro da fase líquida, e a força de atrito causada pela passagem da fase líquida pela fase sólida. A junção destas 3 forças é que proporciona a capacidade viscoelástica à cartilagem articular (Cohen, Mow, e Foster 1998).

## 1.2 Lesões na cartilagem articular

Segundo Olmedilla (2015), as alterações articulares, como por exemplo a repetibilidade de movimentos, traumas ou degeneração mecânica progressiva (Simon e Jackson 2018), resultam em lesões na cartilagem, sendo estas caracterizadas pelo nível com que afetam a MEC, que conseqüentemente afeta os condrócitos. Existem quatro tipos de lesões na cartilagem, identificadas desde o grau 1 até ao grau 4 (**Figura 3**). Este tipo de nomenclatura é atribuído pela *International Cartilage Repair Society* (ICRS) e varia consoante as zonas que são afetadas pela lesão.



**Figura 3** - Exemplos de lesões de cartilagem de acordo com a classificação da *International Cartilage Repair Society* (ICRS)

A lesão de grau 1 afeta a zona superficial da cartilagem e é caracterizada pela perda de poucos componentes da matriz, nomeadamente o colagénio. A lesão de grau 2 afeta as zonas até à intermédia, atingindo os condrócitos e a capacidade de regeneração do tecido cartilaginoso. O grau 3 inclui também uma perda de tecido da zona profunda. Por último, o grau 4 é a lesão mais profunda e de mais difícil resolução/regeneração pois afeta o osso subcondral, incluindo as células medulares (C. Moura 2016; Olmedilla 2015;

Temenoff e Mikos 2000). Esta lesão é rapidamente preenchida com fibrinas, que por sua vez são substituídas pelas células medulares, migrando como forma de resposta à lesão. Contudo, esta tentativa de reparação é lenta resultando numa reparação ineficaz (Buckwalter 1998).

Além disso, existe ainda a osteoartrite ou osteoartrose (OA), classificada como uma lesão progressiva e degenerativa. É causada pela perda gradual da cartilagem, resultando no desenvolvimento de quistos e esporões nas margens das articulações (Olmedilla 2015). É por definição “um distúrbio sinovial nas articulações”. Alguns fatores que predispõem para a OA são: o envelhecimento, o género, a raça, a predisposição genética, a obesidade e ainda a existência de algum tipo de trauma ou alguma ocupação que envolva um movimento repetitivo (Klippel et al. 2008).

Atualmente, existem várias tentativas de tratamento estudadas para tratar lesões da cartilagem, contudo nenhuma terapia é eticamente aceite e se encontra disponível para tratar a degeneração de cartilagem (C. Moura 2016).

### 1.3 Técnicas para reparação da cartilagem articular

---

Nas últimas décadas, várias técnicas têm sido aplicadas para reparar as diferentes lesões que ocorrem na cartilagem (Jeuken et al. 2016). Estas técnicas podem ser separadas entre abordagens presentes e abordagens futuras. Nas técnicas utilizadas atualmente podemos encontrar: a Microfratura, a Implantação de Condrócitos Autólogos e ainda a Técnicas baseadas em *Scaffolds* (Makris et al. 2015).

A Microfratura é um dos métodos mais utilizados para o tratamento da cartilagem articular (Carson 2018). A reparação da cartilagem através desta técnica inclui a remoção dos detritos e a penetração até ao osso subcondral, induzindo a regeneração celular com células do progenitor. Contudo, a estimulação deste crescimento faz com que seja despoletado o crescimento de cartilagem fibrosa, que apresenta propriedades inferiores à hialina (Volesky, Charlton, e Deland 2007).

Na Implantação de Condrócitos Autólogos (do inglês *Autologous Chondrocyte Implantation, ACI*), condrócitos do recetor (autólogos) são isolados e cultivados em laboratório para serem implantados na lesão de baixo da cobertura periosteal. Esta cobertura confere impermeabilidade aos condrócitos (Peterson et al. 2010). No entanto, esta técnica apresenta dois grandes inconvenientes: são necessárias 2 intervenções cirúrgicas, uma para recolher uma amostra de tecido nativo e outra para incorporar os condrócitos no defeito cartilaginoso, e o tempo de recuperação é muito longo, entre 6 a

12 meses, de forma a assegurar a maturação e o crescimento do novo tecido (Makris et al. 2015).

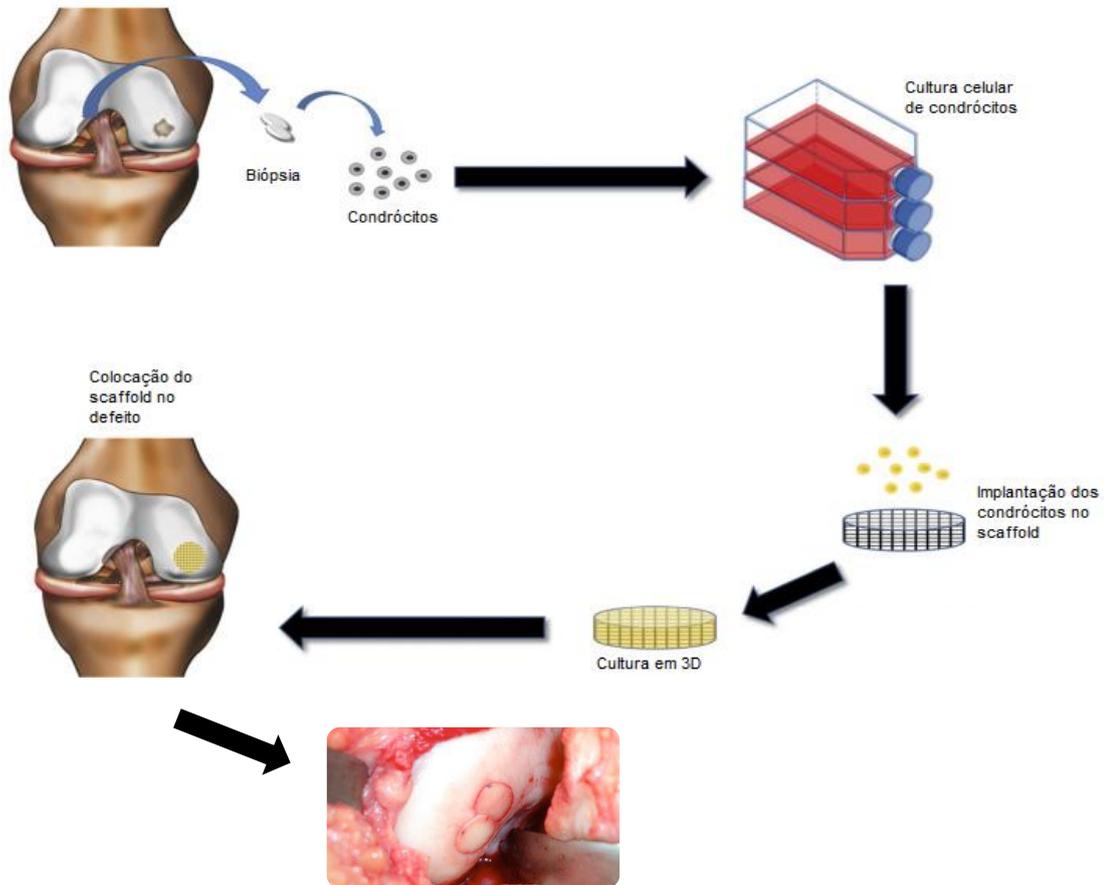
Estudos sobre as técnicas de reparação de cartilagem mencionadas anteriormente, apresentam diferentes resultados, no entanto, a médio-longo prazo todos eles tornam-se insatisfatórios. O principal obstáculo é a tensão mecânica exercida na cartilagem articular, que muitas vezes danifica a original (Ahmadi et al. 2017). Contudo, a solução pode passar pelo recurso à emergente Engenharia de Tecidos (ET). Esta área envolve a implantação de um *scaffold* para regenerar uma lesão cartilaginosa. O *scaffold* é uma estrutura tridimensional (3D) temporária, produzida a partir de materiais biodegradáveis, que estimula a proliferação celular e, conseqüente, produção de MEC (Filardo et al. 2013).

Os *scaffolds* são estruturas feitas a partir de polímeros, nas quais as células se fixam e proliferam, auxiliando a regeneração natural da cartilagem. Para isso é necessário: que exista biocompatibilidade, tanto do *scaffold*, como dos produtos da sua degradação, não devendo provocar uma resposta inflamatória no hospedeiro; ter em conta os tecidos adjacentes à sua colocação de forma a prever a sua resposta ao enxerto; deve ser poroso de modo a permitir o crescimento do tecido e a vascularização; e ainda ter capacidade mecânica suficiente para suportar as tensões exercidas no local de aplicação (Frenkel e Di Cesare 2004). Esta última característica é ainda uma lacuna desta técnica e que tem colocado grandes desafios à ET, que estuda formas de reforçar os *scaffolds* de forma a proporcionar a resistência adequada (Morouço et al. 2016).

## 1.4 Engenharia de Tecidos

---

Surgindo no início dos anos 90, a Engenharia de Tecidos (ET) tem vindo a desenvolver cada vez mais capacidades no campo da reconstrução e regeneração de cartilagem (Vinatier e Guicheux 2016), sendo definida como “um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida ao desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido” (Langer e Vacanti 1993). Para reconstruir totalmente a cartilagem danificada, é importante sintetizar *scaffolds* que imitem rigorosamente as características nativas do tecido, ao mesmo tempo que fornecem suporte para o tecido recém-formado até este amadurecer (M. Liu et al. 2017). Para além das características já enumeradas do *scaffold*, este terá de ser construído a pensar na camada onde vai ser aplicado, uma vez que a conformação e a estrutura dos condrócitos é alterada consoante a camada onde estão inseridos. Na **Figura 4** está representado o processo de implementação de um *scaffold* na cartilagem articular do joelho, com a respetiva cultura celular de condrócitos.



**Figura 4** - Esquemática da implementação de um *scaffold* na cartilagem articular: cultura celular e aplicação do *scaffold* (Adaptado de: Meyer e Wiesmann 2006b; Huang, Hu, e Athanasiou 2016)

## 1.5 Propriedades dos *scaffolds*

Na ET os *scaffolds* são projetados a 3D de modo a fornecer um ambiente propício a apoiar e direcionar os processos celulares, nomeadamente, a migração, proliferação e diferenciação. Por sua vez, podem ser aplicados com ou sem células; no entanto, a sua aplicação sem células é atualmente mais atraente uma vez que a cultura celular é bastante dispendiosa. Os enxertos para aplicações em cartilagem articular requerem propriedades mecânicas complexas capazes de suportar as tensões exercidas na zona articular e ainda as funções celulares. Requerem ainda biocompatibilidade e capacidade de transportar resíduos e nutrientes. Os *scaffolds* podem ser produzidos em diversas formas, incluindo estruturas fibrosas, esponjas porosas, malhas ou hidrogéis (Faust, Guo, e Elisseff 2019). Segundo O'Brien (2011), as principais propriedades exigidas a um *scaffold* são as seguintes:

- **Biocompatibilidade**

Para que um *scaffold* seja biocompatível, as células devem aderir, exercer as suas funções e migrar através do *scaffold* de modo a populá-lo na sua totalidade. Após a implantação do enxerto, este não deve desencadear uma reação imune, com o objetivo de evitar uma resposta inflamatória grave, que conseqüentemente possa vir a reduzir a cicatrização ou causar a rejeição do implante pelo organismo.

- **Biodegradabilidade**

O principal objetivo da aplicação destes implantes temporários, é que, com o passar do tempo, os condrócitos presentes no corpo do hospedeiro, substituam o *scaffold* implantado. Assim, este deve ser degradável, de modo a permitir que as células construam a sua própria MEC e ocupem o espaço do *scaffold*, ao mesmo tempo que este se degrada. Contudo, os produtos resultantes dessa degradação também não devem provocar toxicidade saindo do corpo sem interferir com outros órgãos. De modo a que não ocorra nenhum tipo de rejeição do *scaffold* por parte do organismo recetor, o campo da imunologia está em constante desenvolvimento na procura de alternativas como forma de evitar estas reações.

- **Propriedades mecânicas compatíveis com o local onde vai ser aplicado**

O principal desafio com que a ET se depara prende-se com as propriedades mecânicas do *scaffolds* que devem ser compatíveis com o local onde vai ser aplicado. No caso da utilização de implantes temporários na cartilagem articular, o *scaffold* deve ter suporte mecânico suficiente para manter-se firme desde a implantação até à conclusão do processo de regeneração. Um outro desafio é a variação das taxas de cura com a idade. Indivíduos mais jovens normalmente cicatrizam em cerca de dois meses, já em idosos esta taxa de cicatrização diminui. O fator idade também deve ser tomado em consideração aquando da construção do implante, sendo de alta importância a taxa de degradabilidade do material de construção do *scaffold*. Outra propriedade relevante no campo da construção dos *scaffolds* é a porosidade. Muitos materiais são produzidos com boas propriedades mecânicas, contudo falham quando implantados *in vivo* devido à falta de vascularização. É essencial um equilíbrio entre as suas propriedades mecânicas e a sua arquitetura.

- **Arquitetura**

Os *scaffolds* devem ter uma estrutura de poros interconectados e alta porosidade para garantir o crescimento celular, difusão de nutrientes e a expulsão de produtos da degradação. Outro aspeto que deve ser alvo de atenção, é o tamanho médio dos poros do *scaffold*. Têm de apresentar área suficiente para que haja migração das células para o *scaffold*, adesão celular, diferenciação e proliferação. No entanto, o número de poros

no *scaffold* deve ser específico, de modo a não se atingir um número de células por *scaffold* nocivo para este. Por isso, este número de poros depende das células utilizadas em cultura e do tecido onde vai ser aplicado o *scaffold*.

Para além destas quatro propriedades, é também essencial a escolha dos materiais para a construção destes implantes, uma vez que todas estas características estão dependentes do material a partir do qual o *scaffold* é fabricado (O'Brien 2011).

## 1.6 Tipos de biomateriais usados para produção de *scaffolds*

Uma vez que poderá haver lesão na parte cartilaginosa e/ou também na parte osteocondral, o objetivo principal quando se produz o *scaffold* é replicar de forma perfeita essas camadas onde irá ser aplicado. Para defeitos na camada osteocondral, camadas específicas têm de ser desenvolvidas, havendo uma associação entre regiões cartilaginosas e ósseas. Os defeitos que atingem a camada calcificada são os mais desafiadores porque exigem uma associação de tecidos diferentes, células diferentes e capacidade de regeneração também diferente (Kon et al. 2016; Vinatier e Guicheux 2016). Assim, o biomaterial que vai ser utilizado para reproduzir o tecido do hospedeiro tem de ser o mais adequado para o suporte e para o crescimento celular, e ainda o mais fiel possível ao tecido nativo. Muitos *scaffolds* já foram desenvolvidos e muitos materiais já foram estudados e utilizados, sendo apresentados sumariamente na **Tabela 1**, os polímeros mais referenciados na literatura.

**Tabela 1** - Principais matrizes utilizadas em Engenharia de Tecidos (ET) para regeneração de cartilagem (adaptada de: Rosenzweig et al. 2015; Vinatier e Guicheux 2016)

<b>Tipo</b>	<b>Material</b>
<b>Naturais</b>	Colagénio
	Ácido hialurónico
	Quitosano
	Alginato
	Celulose
<b>Sintéticos</b>	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
	Poli(ácido láctico)

Os materiais podem ser divididos em naturais e sintéticos. Os polímeros naturais primam pela sua estrutura química, capaz de mimetizar o tecido nativo, contribuindo para a biocompatibilidade. Já os polímeros sintéticos detêm a capacidade de ser reprodutíveis, oferecendo um controlo preciso sobre as suas capacidade mecânicas e de degradabilidade (Courtenay et al. 2017).

Dentro dos materiais de origem natural encontra-se o colagénio. Este é a proteína mais abundante na MEC, sendo encontrado em diferentes locais do corpo, como: o osso, cartilagem, tendão, vasos sanguíneos, nervo e pele, uma vez que é a principal proteína estrutural da maioria dos tecidos duros e moles. Além disso, o colagénio oferece uma boa resposta imunológica, porosidade, permeabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e regula a maior parte das funções das células. Todas estas propriedades indicam que este polímero será bastante adequado para aplicação em *scaffolds*. No entanto, possui uma grande desvantagem já que os enxertos construídos com este material não têm resistência mecânica suficiente, o que limita a sua aplicação na cartilagem articular (Dong e Lv 2016).

O ácido hialurónico é um dos componentes principais da matriz cartilaginosa (Frenkel e Di Cesare 2004). Este polissacarídeo oferece a capacidade de proporcionar uma ambiente hidratado, capaz de aprisionar, e auxiliar a adesão e proliferação dos condrócitos (Jeuken et al. 2016). Não desperta uma resposta inflamatória no corpo do recetor, no entanto a sua aplicação pode induzir a condrólise (degeneração da cartilagem), e a cartilagem reparada através deste polímero é mais fina que a do tecido nativo (Frenkel e Di Cesare 2004; C. Moura 2010).

Por sua vez, o quitosano é dos polissacarídeos mais abundantes na natureza, estando presente no exoesqueleto dos crustáceos e insetos (Kumar 2000). Apresenta uma baixa reatividade e ainda uma degradabilidade lenta (Jeuken et al. 2016; Kumar 2000). Além das diversas vantagens que o tornam um possível candidato para construção de um *scaffold*, necessita de uma combinação com outro polímero de forma a suportar as forças de tensão exercidas na cartilagem articular, e a sua estrutura varia consoante a sua fonte (Jeuken et al. 2016; Sivashankari e Prabakaran 2016).

O alginato possui uma boa biocompatibilidade e é de fácil gelificação (Luo et al. 2017). Detém também a capacidade de se degradar lentamente, como desejado, no entanto, possui muitos inconvenientes, tais como a dificuldade em controlar a sua estrutura e a não adesão celular. Esta adesão não ocorre porque o alginato requer reticulação para obter as matrizes, e esta reticulação é feita com iões de cálcio. No entanto as concentrações de cálcio utilizadas *in vitro* são menores que as encontradas na cartilagem, o que leva a um aumento da densidade da matriz, que por sua vez reduz a porosidade, dificultando a adesão das células (Frenkel e Di Cesare 2004; Jeuken et al. 2016).

O fabrico de estruturas 3D com celulose tem vindo a ganhar destaque nos últimos anos (L. Li, Zhu, e Yang 2018; Nordli et al. 2016; Rashad et al. 2017). Para além de ser o polímero mais abundante na natureza, é também biodegradável, biocompatível e não provoca toxicidade (Sheng et al. 2014). As boas características químicas e físicas da celulose conduzem à produção de *scaffolds* com uma excelente rede porosa, na escala dos nano e micron. Tanto a celulose como os seus derivados são biocompatíveis e reabsorvíveis, tornando este polímero numa das escolhas mais promissoras para o fabrico de enxertos na cartilagem articular (Pircher et al. 2015).

Dentro dos polímeros sintéticos, podemos encontrar o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Tem sido amplamente estudado para ser aplicado em *scaffolds*, uma vez que tem demonstrado ser bastante favorável à adesão e proliferação das células, contudo os produtos resultantes da sua degradação são extremamente ácidos, conduzindo a uma diminuição do pH na zona de aplicação do enxerto (Bai e Ouyang 2017; Haaparanta et al. 2015).

Outro polímero bastante utilizado em TE é a poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL). É considerado um ótimo material de suporte uma vez que pode levar anos até à degradação total (com uma taxa de degradação lenta), é biocompatível e relativamente barato (Kim et al. 2015). O baixo ponto de fusão, cerca de 60 °C, e a suas propriedades mecânicas moderadas tornam-no ideal para fabricação de *scaffolds*. No entanto, não é osteoindutivo, função essencial quando se pretende reparar uma lesão tipo IV. Deste modo é necessário incorporar outro material que tenha o efeito desejado (Nyberg et al. 2017).

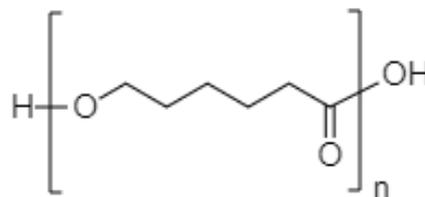
Por fim, o poli(ácido láctico) (PLA) é produzido a partir de policondensação de ácido láctico ou por abertura de anel. A compatibilidade com o corpo humano e a biodegradabilidade do PLA fazem dele um candidato promissor para aplicação em implantes, tais como *scaffolds* ou implantes para libertação de fármacos (Santoro et al. 2016). No entanto, o PLA assume valores de cristalinidade elevados, o que pode levar a uma inflamação após aplicação (Stratton et al. 2016).

Uma vez que a associação entre os materiais de origem natural e sintética demonstra ser mais vantajosa para construção de um *scaffold*, dado que melhora problemas indesejáveis associados à hidrofobicidade, à fixação de células e à biodegradabilidade, os polímeros que demonstram mais interesse em ser conjugados são a PCL e a celulose (Bellani et al. 2016; Stratton et al. 2016). Estes podem ser misturados de forma química ou física. Quimicamente, a cadeia de PCL (**Figura 5**) formada através de uma polimerização de anel aberto do monómero  $\epsilon$ -CL é aberta de modo a ser introduzida a cadeia de celulose (**Figura 6**) (Yu et al. 2018). Como se trata de um processo moroso e pouco estudado, o mais vantajoso será unir estes dois polímeros de forma física e avaliar a melhoria das suas propriedades.

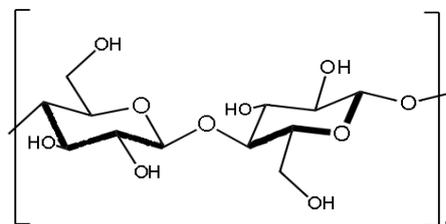
A celulose que se tem usado provém da exploração massiva da madeira. Do ponto de vista da sustentabilidade, esta exploração tem levado à destruição de florestas, que junto com os incêndios e outras causas levaram a uma diminuição de quase 200 000 ha, entre 1999 e 2016 (INE 2018). Por esta razão, explorou-se 6 outras fontes de celulose (carolo de milho, folha de espiga de milho, bagaço de medronho, engaço de uva, casca de romã e vagem de fava), todas elas provenientes de resíduos agro-industriais.

A celulose pode ser usada para diversas aplicações, como imobilização enzimática, síntese de materiais antimicrobianos, biossensores, agentes transportadores de fármacos, etc. São também usados em diversas aplicações biomédicas, como adesivos cicatrizantes, *scaffolds* em ET ou marcadores de fluorescência (George e Sabapathi 2015; Y. Li et al. 2016).

Assim, a produção de *scaffolds* para aplicação biomédica, nomeadamente na regeneração de cartilagem articular, será desenvolvida através da mistura do polímero PCL e da celulose da fonte que se revelar mais promissora. Como ponto de comparação utilizou-se a celulose microcristalina, pois é uma celulose proveniente da madeira, com elevados graus de pureza e com proeminentes estudos na literatura (Maria Elena Alemán-Domínguez et al. 2019; Trache et al. 2016).



**Figura 5** - Estrutura da Poli( $\epsilon$ -caprolactona)



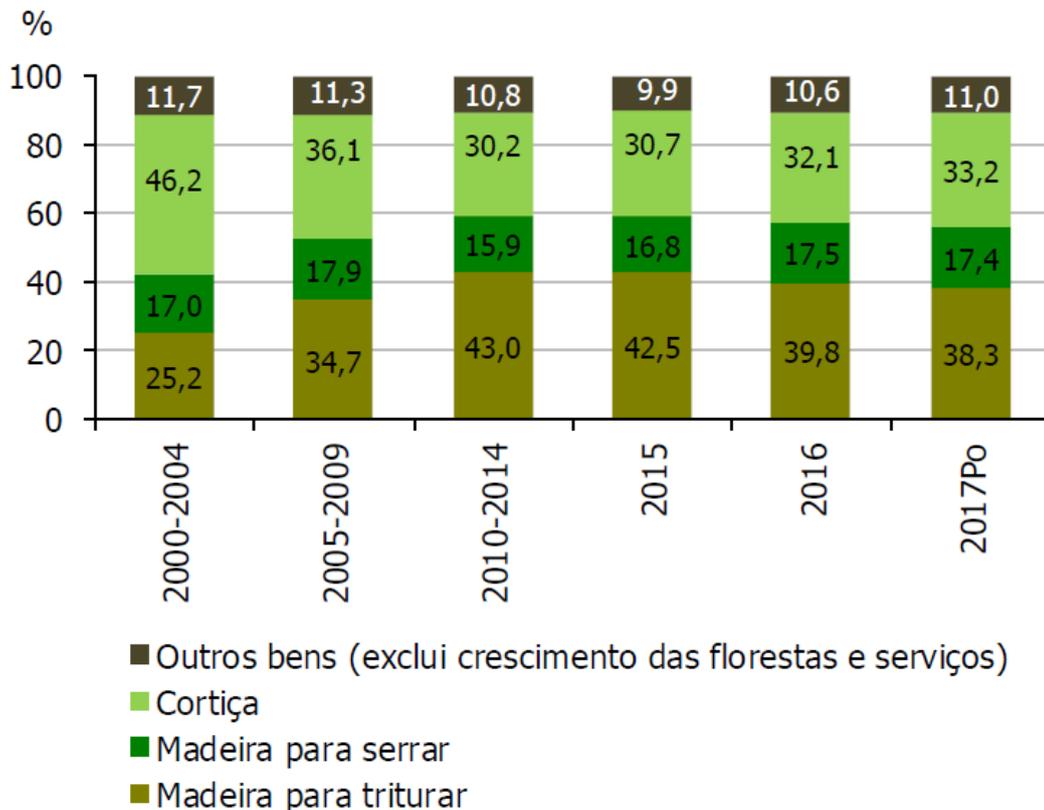
**Figura 6** - Estrutura da celulose

## 1.7 Celulose

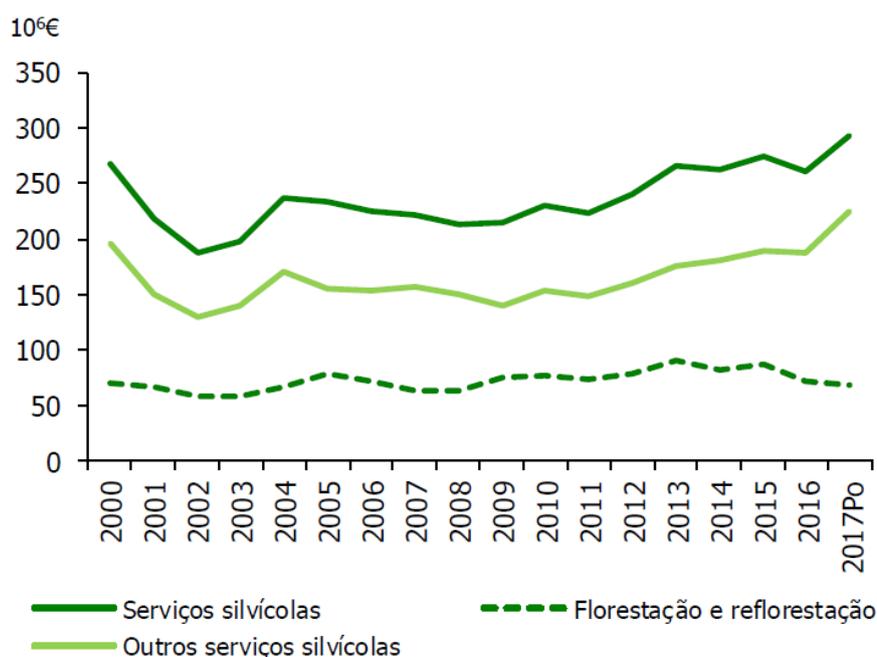
Em 1838, Anselme Payen, um químico francês, observou uma fibra sólida bastante resistente a tratamentos com ácidos e extrações com água, etanol e éter. Estes tratamentos eram aplicados a matérias vegetais e a fibra analisada foi classificada com a fórmula molecular de  $C_6H_{10}O_5$ , embora só 1 ano mais tarde lhe fosse atribuída a terminologia “celulose” (Klemm et al. 2005).

As maiores fontes de celulose são a madeira e o algodão, sendo principalmente usadas como fontes de calor, na indústria do papel ou como materiais de construção (Nechyporchuk, Belgacem, e Bras 2016).

A madeira utilizada na indústria do papel, denominada “madeira para tritarar”, é essencialmente proveniente de eucalipto e, em consequência do desenvolvimento desta indústria a nível nacional, a produção desta madeira tem registado aumentos, como indicado na **Figura 7** (INE 2019). Esta madeira apresenta cerca de 46% de celulose na sua composição, sendo muitas das vezes extraída em forma de nanocristais. Estes nanocristais, podem ser usados em diversas aplicações, nomeadamente em aplicações biomédicas. Contudo, este recurso implica o abate sistemático de árvores e a reflorestação não tem conseguido dar resposta aos níveis de exploração massiva da madeira por parte de todas as indústrias (**Figura 8**) (INE 2019).



**Figura 7** - Produção de madeira, cortiça e outros bens (INE, 2017)



**Figura 8** - Produção de serviços silvícolas e florestação/reflorestação (€) (INE, 2017)

Deste modo, seria interessante poder-se continuar a explorar a celulose, sem recurso a esta matéria-prima, uma vez que é uma fonte de lenta renovação e com elevada taxa de consumo. Assim, é urgente criar-se fontes alternativas, tais como os resíduos agroindustriais.

Vários autores já isolaram e caracterizaram celulose proveniente de fontes agroindustriais, tais como o carolo do milho, palhas do alho, palhas de arroz, folha de espigas de milho, resíduo de exploração de bananas, folhas de coco, da casca de ervilha, medronho, engaço de uva ou folhas de soja (Amendola et al. 2012; Y. Chen et al. 2009; Fahma et al. 2011; Hassan et al. 2012; Kallel et al. 2016; M. Li et al. 2014; Mendes, Carlos Augusto de Carvalho Ferreira, Naiara Marinho Sgambato Furtado e de Sousa 2015; Neto et al. 2013; Özcan e Haciseferogullan 2007; Zuluaga et al. 2009).

## 1.8 Técnicas para produção de *scaffolds*

A técnica de fabricação do *scaffold* é o último critério para o projeto da sua construção. Todos os requisitos e propriedades do *scaffold* enumerados anteriormente dependem da técnica utilizada (Soundarya et al. 2018). Atualmente, existem muitas técnicas de produção de *scaffolds*, contudo as que demonstram melhores resultados em termos de porosidade, inter-conectividade e incorporação celular são as técnicas de fabricação aditiva (do inglês *Additive manufacturing*, AM) (Santos, Almeida, e Bártolo 2013). Estas apresentam vantagens, tais como a versatilidade geométrica, associada ao

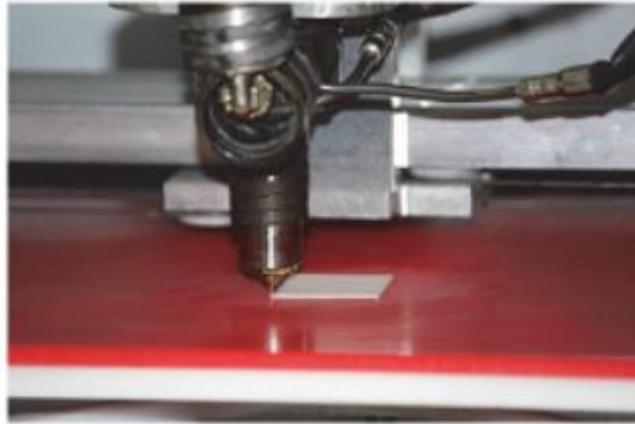
seu controle sob a sua geometria, e a pouca intervenção humana (Y. Zhang et al. 2018). Podem ser classificadas em 4 categorias de processo: Estereolitografia (do inglês *stereolithography*, SLA), Sinterização seletiva a laser (do inglês *selective laser sintering*, SLS), Impressão tridimensional (do inglês *three-dimensional printing*, 3DP) e Modelação por deposição fundida (do inglês *fused deposition modelling*, FDM) (Mota et al. 2015).

A SLA é uma das técnicas mais utilizadas, baseando-se num processo de fotopolimerização. Uma resina é colocada no estado líquido sob o reservatório onde se fará incidir uma luz UV ou IV de modo a curar a resina (Manapat et al. 2017). A cura dos materiais ocorre devido à presença de um foto-iniciador (Moura 2016). Com esta técnica é possível encapsular células na matriz (Mota et al. 2015), contudo, está sempre limitada ao uso de foto-polímeros, a erros de processo como a cura excessiva e ainda aos elevados custos dos materiais (Gao et al. 2015).

No caso da SLS, um pó de baixa granulometria é aquecido por um raio *laser* de forma a fundir os grãos. Após a primeira camada formada, uma nova “cama” de pó é aplicada para que se funda, e assim sucessivamente. Este processo é bastante sustentável, pois é possível recolher o material que não foi sinterizado e reciclá-lo, permitindo também um alto grau de pormenorização. No entanto, revela-se uma técnica muito lenta (Bikas, Stavropoulos, e Chryssolouris 2016).

A 3DP é uma técnica muito similar ao SLS, baseando-se na deposição de camadas de material em pó. Contudo, a união das partículas é feita através de um agente aglutinante inserido num bocal que vai passando sob o pó conferindo-lhe a estrutura desejada. Após esta etapa é feito um aquecimento como forma de cura deste agente aglutinador (Ji et al. 2018). Uma vez que esta técnica não necessita de laser podem ser adicionados materiais bioativos, porém quanto a estrutura da matriz é complexa a arquitetura não se apresenta bem definida (Brunello et al. 2016).

Por último, a FDM é um processo baseado na extrusão, na qual um termoplástico é aquecido até ao seu ponto de fusão e depositado em forma de filamento numa plataforma (J. Zhang e Jung 2018). Ao ser depositado arrefece e solidifica, dando possibilidade de depositar as camadas seguintes (Richter et al. 2016). A sua estrutura 3D apresenta boas propriedades mecânicas, todavia o equipamento necessita de otimização na temperatura das resistências de modo a não provocar a degradação dos polímeros na extrusão (Mota et al. 2015). Sendo esta a técnica com mais vantagens na utilização dos polímeros em estudo, e na qual o único inconveniente é a otimização do sistema, este será o processo utilizado na produção dos *scaffolds* de PCL com celulose (**Figura 9**).



**Figura 9** - Sistema real de FDM (*Fused Deposition Modelling*) (Morouço et al. 2016)

## 1.9 Objetivos

---

No presente trabalho, o objetivo principal foi encontrar fontes alternativas (sustentáveis e competitivas) de celulose com boas propriedades para produzir estruturas tridimensionais a partir dos polímeros à base de PCL e celulose. A técnica de impressão que melhor se adapta ao pretendido é a modelação por deposição fundida (FDM). Para isso extraiu-se e caracterizou-se a celulose de vários resíduos agroindustriais (carolo de milho, folha de espiga de milho, engaço de uva, casca de romã, bagaço de medronho e vagem de fava). A celulose que apresentasse os melhores rendimentos e propriedades físico-químicas seria usada na extrusão dos *scaffolds*, que seriam caracterizados por forma a avaliar as suas propriedades e potencialidades. Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- Extração/purificação de celulose a partir de resíduos agroindustriais e avaliação do rendimento de extração;
- Caracterização da celulose obtida das várias fontes através de análise morfológica, térmica e química;
- Aplicação da técnica de FDM na produção de *scaffolds* com mistura de celulose microcristalina e PCL (controlo) e celulose proveniente dos agrosresíduos e PCL, e comparação com *scaffolds* obtidos com mistura de celulose microcristalina e PCL;
- Avaliação das propriedades morfológicas, mecânicas e de resistência às reações enzimáticas dos *scaffolds*.

## Capítulo 2 Materiais e Métodos

---

Neste capítulo são descritos todos os materiais e reagentes, tais como os protocolos, utilizados ao longo do trabalho experimental, de modo a concretizar os objetivos propostos. Assim, esta secção está organizada da seguinte forma:

- Extração e purificação da celulose das diferentes fontes agroindustriais;
- Caracterização física e química de todas as celuloses;
- Produção de *scaffolds* com a mistura de PCL e celulose;
- Caracterização física, mecânica e enzimática de todos os *scaffolds*.

Os agroresíduos utilizados neste trabalho como fontes de celulose foram: as folhas de espiga de milho, o carolo de milho, o engaço de uva, a casca de romã, o bagaço da extração de polpa de medronho e a vagem de fava. A partir destas fontes, tentou perceber-se quais seriam as mais relevantes para a produção dos *scaffolds*.

### 2.1 Extração e purificação da celulose

---

Foram usadas diferentes metodologias para a extração da celulose dos resíduos agroindustriais, resultando num único procedimento adaptado de métodos existentes na literatura. Posteriormente, de forma a caracterizar as celuloses obtidas foi utilizado um conjunto de técnicas de análise.

Antes do processo de extração e purificação propriamente dito, o material vegetal sofreu um pré-tratamento que consistiu na sua secagem e redução de tamanho, através de trituração.

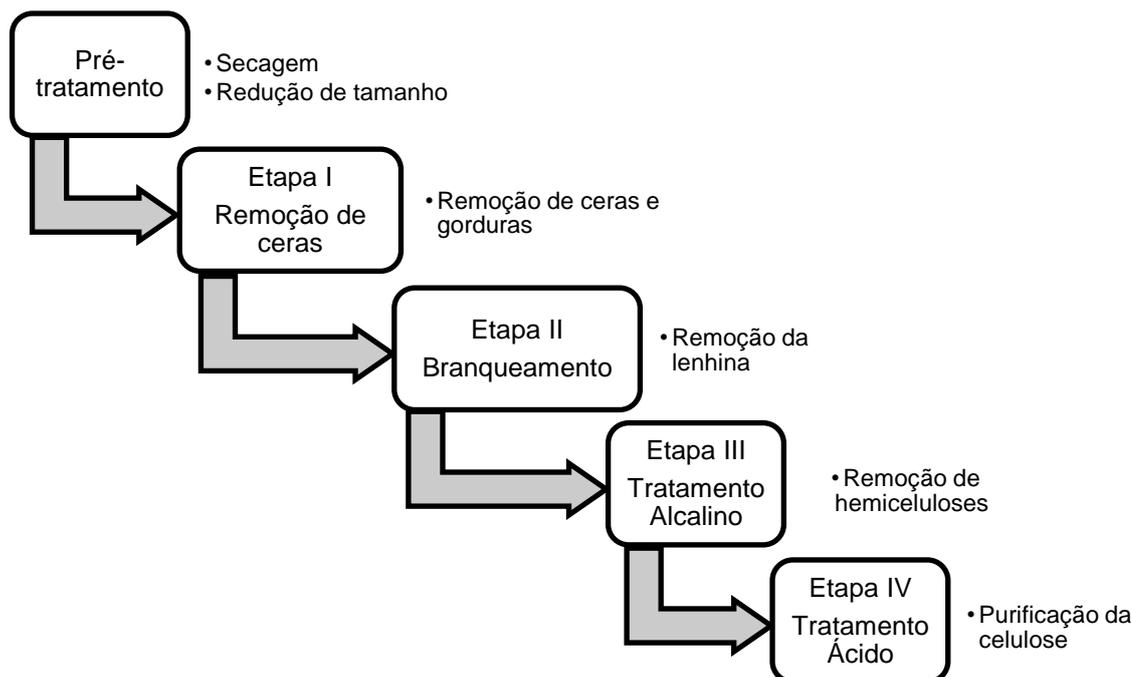
Para a etapa da secagem, os agroresíduos em bruto foram secos a 50 °C num secador com circulação forçada de ar (1,0 m/s) durante 20 h. De seguida, a trituração foi efetuada num moinho de facas para compostos orgânicos SM100 (Retsch) de modo a obter tamanhos de partículas inferiores a 2 mm para todas as matérias-primas. Este material foi acondicionado até utilização em sacos de plástico devidamente selados em local fresco e seco.

A humidade residual do material triturado, que serviu de base para a extração de celulose, foi determinada através da perda de massa após secagem em estufa de ar quente (Memmert, Germany) a 105 °C durante a noite. O ensaio foi feito em triplicado e os resultados apresentados como média ± desvio padrão.

O processo físico químico de extração e purificação da celulose, depois de adaptado de várias referências bibliográficas (Flauzino Neto et al. 2013; Maheswari, C. U., Reddy,

K. O., Muzenda, E., Guduri, B. R., & Rajulu 2012; Morán et al. 2008; Silvério et al. 2013), e cujo esquema simplificado se apresenta na **Figura 10**, foi aplicado às várias matérias-primas. Assim, os agroresíduos secos e triturados foram submetidos a quatro etapas sequenciais de extração:

- I) desparafinação, essencial para a remoção de ceras presentes;
- II) branqueamento, para remoção da lenhina;
- III) tratamento alcalino, para remoção da hemicelulose; e
- IV) tratamento ácido, para purificação da celulose bruta.



**Figura 10** - Esquemática das etapas de extração/purificação da celulose

Na primeira etapa, o material é desparafinado por refluxo com uma mistura de tolueno 99% (Chemopharma, França) e etanol 100% (ChemLab, Bélgica) numa razão de 2:1 (v/v) num extrator Soxhlet (250 mL) durante 6 h, usando uma relação sólido:solvente de 1:20 (g/mL). Após arrefecimento, o material é filtrado e lavado com etanol 96% (ChemLab, Bélgica) durante 30 min. De seguida, o material já desparafinado é novamente seco em estufa de ar quente a 105 °C durante a noite e pesado depois de seco, de forma a ser armazenado para continuação das etapas de purificação.

Para a etapa de branqueamento, é preparada uma solução tampão de acetato misturando 27 g de hidróxido de sódio (NaOH) 99.9% (Chemopharma, França) em 75 mL de ácido acético glacial 99-100% (ChemLab, Bélgica), perfazendo até 1 L com água destilada (dH<sub>2</sub>O). Em seguida, é preparada uma solução aquosa de 17 g/L de clorito de sódio (NaClO<sub>2</sub>, 80%) (Fluka, Alemanha) e outra de 22,7 g/L de bissulfato de potássio (KHSO<sub>4</sub>, 95%) (Riedel-de-Haën, Alemanha). Nesta etapa, a proporção sólido:solvente é

de 1:40 (m/v) e as amostras são sujeitas a deslignificação durante 4 h em ebulição, numa mistura de tampão acetato e NaClO<sub>2</sub> na razão de 1:1 (v/v). A amostra é arrefecida e seguidamente filtrada e lavada com a solução de KHSO<sub>4</sub>, dH<sub>2</sub>O e etanol 96%, respetivamente.

Na terceira etapa, o tratamento alcalino, é preparada uma solução aquosa de NaOH 175 g/L e outra de ácido acético a 10%, na razão de sólido:solvente de 1:50 (g/mL). As hemiceluloses são então removidas com a solução de NaOH à temperatura ambiente num agitador orbital Unimaz 1010 (Heidoph, Germany), a 60 rpm durante 45 min. Neste passo obtém-se a celulose bruta que é filtrada e lavada com ácido acético 10% e dH<sub>2</sub>O, respetivamente.

Por último, na etapa do tratamento ácido, é preparada uma solução de ácido acético 80%. A celulose bruta é tratada de forma a remover as impurezas com uma mistura 10:1 (v/v) de ácido acético 80% e ácido nítrico 65% (HNO<sub>3</sub>) (ChemLab, Bélgica), durante 15 min a 120 °C, usando uma razão sólido:solvente de 1:40 (g/mL). Após arrefecimento, a amostra é cuidadosamente filtrada, pois a celulose encontra-se dispersa e de tamanho bastante reduzido. De seguida é lavada com etanol 96% e dH<sub>2</sub>O por forma a remover o excesso de ácido. Por fim, a celulose purificada é seca em estufa a 105 °C durante a noite, de forma a ser armazenada em recipientes herméticos para posterior análise.

Para cada resíduo, o processo de extração e purificação foi realizado em triplicado. De forma a quantificar o rendimento de extração em cada etapa, entre cada fase do processo ( $\eta_p$ ), as amostras depois de lavadas foram secas em estufa a 105 °C durante a noite, pesadas, armazenadas e usadas (Equação 1). No final do processo, foi também determinado o rendimento global de extração ( $\eta_t$ ) (Equação 2).

$$\eta_p (\%) = \frac{m_p}{m_0} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$\eta_t (\%) = \eta_p (\%) - \eta_{(p-1)} (\%) \quad \text{Equação 2}$$

## 2.2 Caracterização da celulose

A celulose obtida a partir das várias fontes, foi caracterizada visualmente e ao microscópio, quimicamente por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e as suas propriedades térmicas avaliadas por análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento (TGA/DSC).

### 2.2.1 Análise morfológica

Procedeu-se à observação das celulosas obtidas através de microscopia, de forma a comparar com a observação a olho nu. Esta análise foi realizada num microscópio eletrónico Zeiss Stemi 2000-C, com uma ampliação de 20X.

### 2.2.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A composição química da celulose foi efetuada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em modo de refletância atenuada (ATR), com recurso ao Alpha-P Bruker FTIR-ATR. As amostras secas foram misturadas com um pequeno volume de NaOH (0,1 M) de forma a criar uma pasta, auxiliando a análise. Estas misturas foram prensadas no sensor e analisadas entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Para cada amostra foram realizados um total de 64 *scans*, e a análise foi realizada em triplicado.

### 2.2.3 Análise térmica – TGA/DSC

A análise térmica foi realizada com recurso ao STA 6000 (Perkin Elmer) *Simultaneous Thermal Analyser*. A quantidade de amostra usada em cada medição foi cerca de 10 mg. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. As amostras foram aquecidas de 30 a 600 °C a 10 °C/min sob atmosfera de azoto de 20 mL/min, sendo possível retirar a temperatura de degradação, a perda de água e a perda de massa total. O software utilizado nesta análise foi o Pyris™.

## 2.3 Produção de *scaffolds*

---

Antes de iniciar a extrusão dos *scaffolds*, foi necessário proceder-se à mistura dos polímeros selecionados. Este passo é fundamental para que haja uma ligação entre os polímeros antes da produção, ou seja, para que haja uma maior homogeneização dos materiais a usar. Esta mistura foi realizada através do método *solvente casting*, que corresponde a «um processo para formar amostras de polímeros termoplásticos», recorrendo à dispersão do polímero através de um solvente orgânico, depositando-o num molde e removendo-lhe o solvente, de forma a criar uma película semelhante a um filme (Chemistry 2019; Deng et al. 2018). Para tal, o solvente utilizado foi a dimetilformamida e os polímeros selecionados foram a PCL e a celulose de carolo de milho. Como amostra controlo foi utilizada celulose microcristalina, uma vez que provem da madeira e está bem caracterizada na literatura na construção de *scaffolds* (Maria Elena Alemán-Domínguez et al. 2019; W. Chen et al. 2011; Murphy e Collins 2018).

### 2.3.1 Mistura de polímeros

Para se produzirem os *scaffolds* foi realizada, previamente, a mistura dos dois polímeros a utilizar na formulação. Este protocolo pode ser dividido em 2 fases. A primeira fase passa pela preparação da solução de PCL (Perstorp, Reino Unido) com peso molecular de 6500 g/mol com dimetilformamida (DMF) (Chem-Lab, Bélgica) na proporção de 1:3 (m/v), durante 1 h a 80 °C, sob agitação constante. A segunda fase diz respeito à mistura de celulose com DMF. Esta mistura foi preparada numa proporção de 1:100 e 1:50 (m/v), recorrendo à utilização de um homogeneizador por ultrassons (Hielsher UP200Ht), durante 15 min à temperatura ambiente. Depois de preparadas as misturas relativas à fase 1 e 2, a solução final foi obtida com a junção das duas, sob agitação constante a 80 °C durante 3h, cuja concentração final de celulose é de 2,5 mg/mL (~1%) e 5 mg/mL (~2%).

Por fim, a mistura foi depositada em caixas de Petri para secar à temperatura ambiente (20-25 °C) durante 7 dias, de forma a evaporar a DMF da mistura.

No total foram realizadas 4 misturas de PCL com celulose, classificadas da seguinte forma:

- PCL + celulose microcristalina ~1% → M\_1%
- PCL + celulose microcristalina ~2% → M\_2%
- PCL + celulose carolo de milho ~1% → CM\_1%
- PCL + celulose carolo de milho ~2% → CM\_2%

As concentrações escolhidas para este trabalho tiveram por base um estudo realizado por Maria Elena Alemán-Domínguez (2019), que indicam que a inclusão de 2% de celulose microcristalina em *scaffolds* de PCL, melhoram as suas propriedades, de tal forma que os torna promissores para aplicações em ET.

### 2.3.2 Extrusão de *scaffolds*

A extrusão dos *scaffolds* foi realizada através da técnica FDM utilizando a Bioextruder (Domingos et al. 2010), um equipamento desenvolvido nas instalações do CDRSP. De modo a produzir matrizes com estruturas internas e externas controladas, foi desenvolvido um código computacional através do programa MatLab de forma a introduzir os comandos no equipamento. Estas estruturas foram projetadas como cilindros, de forma a que a sua secção transversal apresentasse um diâmetro de 10 mm, com um diâmetro de fibra de 300 µm e composto por 10 camadas. Foi ainda necessário otimizar as temperaturas de todas as resistências de modo a obter as temperaturas ideais para a produção de *scaffolds*, tendo em conta os fatores externos como a temperatura da sala e

a humidade do ar. Assim, os parâmetros utilizados na produção das *scaffolds* foram dos indicados na **Tabela 2**.

**Tabela 2** Parâmetros utilizados para a extrusão dos *scaffolds* através da técnica de FDM

Parâmetro	Condição
Diâmetro da agulha	22 ga / 400 µm
Temperatura do depósito	75 °C
Temperatura da extrusora	80 °C
Temperatura do sistema de corredor	100 °C
Humidade relativa da sala	32-38%
Velocidade do fuso	8 mm/s
Velocidade de fluxo de material	14,6 rpm

Quando os filamentos são depositados, o alinhamento destes foi de 0°/90°. O equipamento encontra-se ligado a uma fonte de tensão, que faz movimentar um fuso, em parte responsável pela deposição do material, cuja velocidade máxima é 24 V, equivalente a 50 rpm. Deste modo, a tensão utilizada foi de 7 V, correspondendo a uma velocidade de fluxo de material de 14,6 rpm.

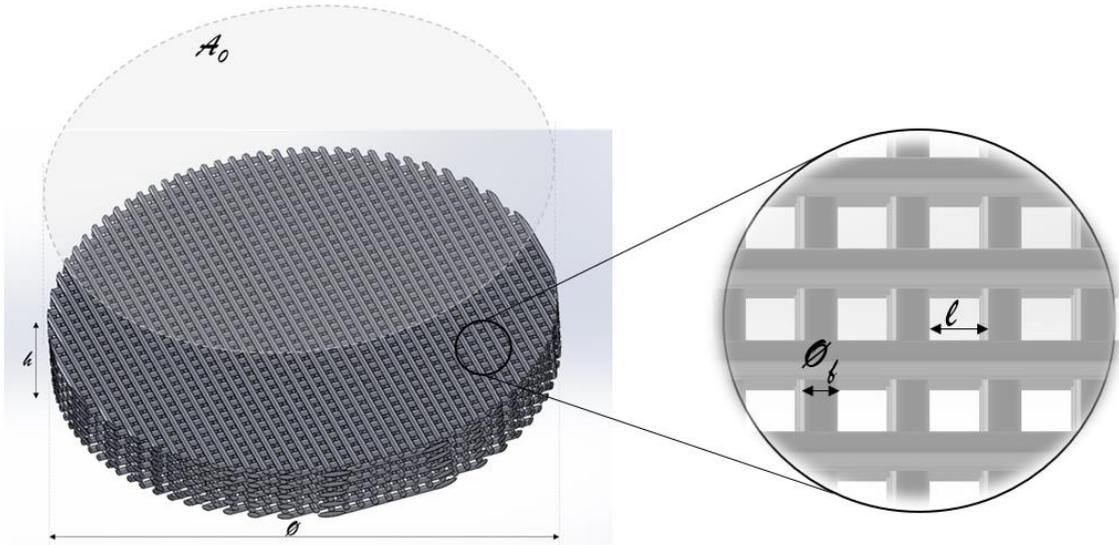
## 2.4 Caracterização dos *scaffolds*

Após a produção dos *scaffolds*, estes foram caracterizados através de uma análise termogravimétrica e de calorimetria diferencial de varrimento (TGA/DSC), morfologicamente através de microscopia ótica e por microtomografia computadorizada (MicroCT), mecanicamente, de forma a avaliar as suas resistências à compressão e, por fim, enzimaticamente, sendo submetidas a degradação ao longo de 28 dias.

### 2.4.1 Análise morfológica

Todas as amostras foram analisadas morfologicamente: *i*) dimensões gerais com um paquímetro (diâmetro ( $\emptyset$ ) e a altura ( $h$ )); *ii*) microscopia ótica (tamanho de poros ( $\emptyset$ ) e filamentos ( $\emptyset_f$ )); e *iii*) microtomografia computadorizada (porosidade, interconectividade e dispersão da celulose) (**Figura 11**). Apesar da observação ao microscópio ótico (Micros, Áustria) fornecer uma boa resolução de imagem, através do software Microvisible, a microtomografia computadorizada (do inglês *Micro-Computed Tomography*, MicroCT), designada SkyScan 1174TM acede à microestrutura 3D das matrizes. Este equipamento

é composto por uma fonte de raio-X de 50 kV/40 W e uma câmara de raio-X de 1,3 megapixel.



**Figura 11** - Representação esquemática de um *scaffold* com as suas dimensões macro e microscópicas

Os parâmetros utilizados para a digitalização das amostras foram: um passo de 0,7 à volta do eixo medio-lateral, resultando em 210 imagens, a tensão de aceleração de 50 kV, uma corrente de feixe de 800  $\mu$ A, o tempo de exposição de 3500 ms, o tamanho do pixel da imagem de 9,6  $\mu$ m e não foi usado nenhum filtro.

Foi realizado uma reconstrução 3D utilizando o software NRecon, e uma análise morfológica utilizando o software CT-Analyser. Em MicroCT, a análise morfológica consistiu em: *i*) identificar e definir a região de interesse (ROI) nas projeções 2D; e *ii*) seleccionar os níveis de intensidade limites (0 a 255) que correspondem ao material. Através da análise morfológica podem-se obter vários parâmetros para descrever os *scaffolds*, como é o caso da porosidade e interconectividade entre poros (Equação 3 e Equação 4).

$$\text{Porosidade}(\%) = \frac{\text{Volume de poros}}{\text{Volume total do scaffold (poros e não poros)}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Interconectividade} (\%) = \frac{\text{Volume dos poros interconectados}}{\text{Soma dos volumes dos poros fechados e interconectados}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Foi também utilizado o software DataViewer para obter imagens das vistas coronal, sagital e transversal dos *scaffolds*, assim como calcular as suas dimensões de poro e filamento e o software CTVox para obter as imagens em 3D.

#### 2.4.2 Análise térmica - DSC/TGA

A análise térmica foi realizada nas mesmas condições que a análise descrita na subsecção 2.2.3 da secção 2.2, relativa à caracterização da celulose, apresentada neste mesmo capítulo.

#### 2.4.3 Análise mecânica

Foi testada a resistência mecânica dos vários *scaffolds*. Esta resistência é medida através de um teste de compressão, utilizando um equipamento de teste universal (Instron 5544, EUA) equipado com uma célula de carga de 100 kN e com uma taxa de extensão de 1 mm/min. Durante o teste, as amostras foram comprimidas até cerca de 50% da sua altura. A força aplicada nas amostras, em Newton (F) foi utilizada no cálculo da tensão de compressão, em MPa ( $\sigma$ ) através da Equação 5. Por sua vez, a extensão ( $\varepsilon$ ) foi calculada segundo a Equação 6 pela diminuição da espessura do material, em mm ( $\Delta L$ ) face à sua altura inicial (L) antes da compressão.

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad \text{Equação 5}$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L} = \frac{(1-L)}{L} \quad \text{Equação 6}$$

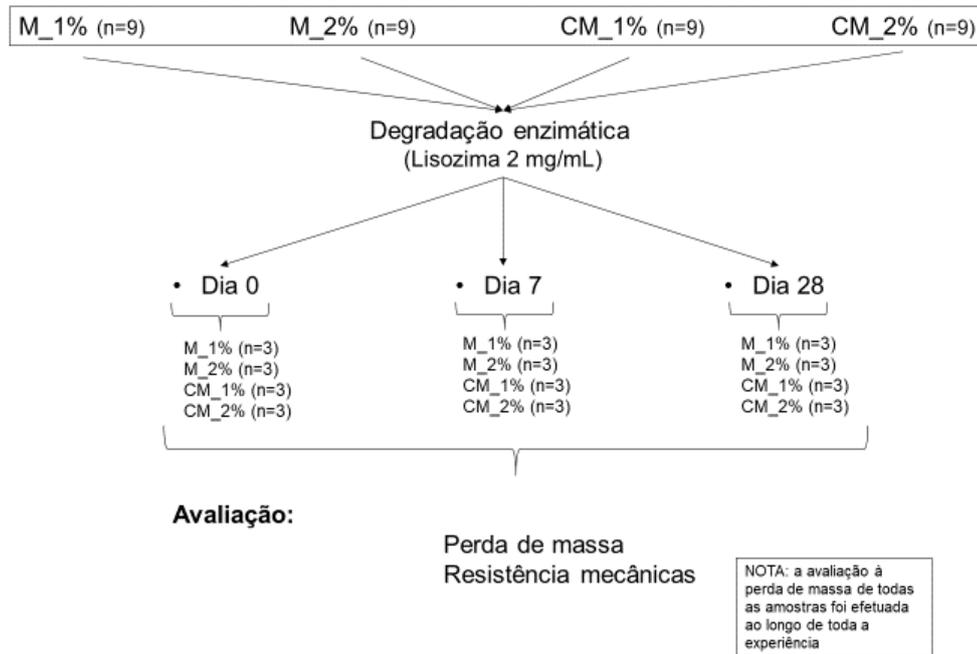
Por fim, o módulo de compressão (E) foi calculado através do declive da região linear na curva tensão-extensão. Foram testadas 5 amostras de cada mistura (M\_1%, M\_2%, CM\_1% e CM\_2%).

#### 2.4.4 Análise degradação enzimática

Aquando à ocorrência de situações traumáticas, como a artrite reumatoide, os níveis de lisozima presentes da cartilagem articular aumentam (Greenwald et al. 1972). A concentração média encontrada na cartilagem do joelho, nessas mesmas situações, é aproximadamente 1,31  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de cartilagem. Assim, como forma de avaliar a resistência dos *scaffolds* produzidos a esta mesma enzima, estes foram sujeitos a degradação para posteriormente ser avaliada a perda de massa e a resistência à compressão.

Foram colocadas 9 *scaffolds* de cada mistura a incubar no meio tampão fosfato-salino (do inglês *Phosphate-Buffered Saline*, PBS) (Alfa Aescar, Alemanha), a pH 7,4, com uma concentração de 2 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich, Canadá). A lisozima foi adicionada ao meio PBS sob agitação a 100 rpm durante 10 min. De seguida 1 mL de meio foi adicionado a cada poço e colocado a incubar a 37 °C. Os meios foram mudados a cada 7 dias. Ao 0º, 7º (1 semana) e 28º (1 mês) dias de experiência, três *scaffolds* foram pesados e testados quanto à sua resistência mecânica (Correia et al. 2011).. Para isso,

estes foram removidos dos poços, lavados com 1 mL de etanol e deixados a secar durante a noite, à temperatura ambiente. O protocolo encontra-se esquematizado na **Figura 12**.



**Figura 12** - Representação esquemática do protocolo de degradação enzimática realizada aos *scaffolds*

## 2.5 Análise estatística

Todos os resultados foram analisados e tratados no Excel 2017. As análises estatísticas foram efetuadas no software GraphPad Prism 6, com recurso a ANOVA de entrada simples ou de dupla entrada, sempre que possível. Diferenças estatísticas entre os materiais avaliados foram consideradas para um  $p$ -value (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## Capítulo 3 Apresentação e discussão de resultados

---

Neste capítulo serão apresentados todos os resultados obtidos ao longo deste estudo, e a respetiva discussão, separados da seguinte forma:

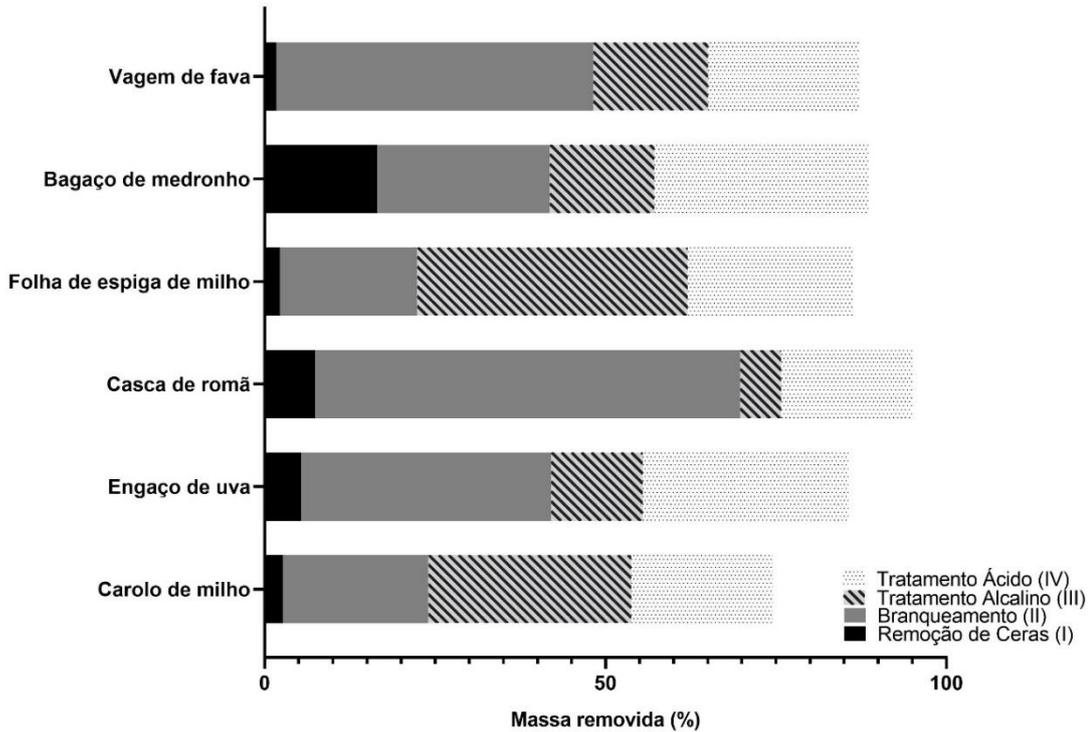
- Validação do processo de extração das celulosas das diferentes fontes agroindustriais;
- Caracterização morfológica, química e física das celulosas obtidas;
- Caracterização térmica, morfológica, de resistência à compressão e enzimática dos *scaffolds* produzidos a partir das misturas de PCL e celulose.

O processo de extração de celulose foi realizado para todas as matérias-primas: carolo de milho, engaço de uva, folha de espiga de milho, casca de romã, bagaço de medronho e casca de fava, tal como a sua caracterização. Através da análise cuidada dos resultados obtidos, foi selecionada a celulose que apresentou melhores características, ou seja, a que globalmente apresentou maior rendimento e melhores propriedades físicas e químicas, para a produção dos *scaffolds*. A celulose microcristalina foi usada como controlo.

### 3.1 Extração da celulose dos vários agroresíduos

---

Como forma de reduzir o impacto da utilização da celulose proveniente da madeira, foram então selecionadas 6 matérias-primas renováveis para avaliar o seu conteúdo em celulose. Todas as matérias-primas selecionadas são provenientes de resíduos agroindustriais (carolo de milho, engaço de uva, casca de romã, folha de espiga de milho, bagaço de medronho e vagem de fava), no sentido de lhes oferecer uma valorização, primando também pela sua abundância. Em todas elas foi aplicado o mesmo protocolo de extração, constituído por 4 etapas: a remoção de ceras (I), o branqueamento (II), o tratamento alcalino (III) e o tratamento ácido (IV). Entre cada etapa foi avaliada a percentagem de massa removida, correspondendo teoricamente à perda dos componentes que são expectáveis de serem eliminados na sua etapa (**Figura 13**).



**Figura 13** - Quantidade de material removido em cada etapa de extração, para as diferentes matérias-primas

Como é visível, após o passo I foi possível avaliar a quantidade de ceras/gorduras por que cada matéria-prima é composta. Notoriamente, o bagaço de medronho é a matéria onde houve maior remoção de ceras, com cerca de  $16,5 \pm 1,70\%$ . Autores referenciam que a percentagem de óleos e gorduras presentes no medronho rondam os  $2,10\%$  e  $1,37\%$  (Barros et al. 2010; Özcan e Haciseferogullan 2007), valores muito inferiores aos encontrados, no entanto o elevado valor de remoção poderá ser explicado pelo facto de nesta etapa não terem sido removidos só as ceras/gorduras, mas também os açúcares presentes nesta matéria, que representam cerca de  $40\%$  da constituição do fruto (Barros et al. 2010). Contudo não é registado este valor de remoção uma vez que, a matéria utilizada não tinha parte da polpa. A casca de romã foi a matéria que, seguidamente ao bagaço de medronho, apresentou maior remoção de ceras/gorduras, com um valor de  $7,4 \pm 0,7\%$ . Este valor é similar aos referenciados na literatura, de cerca de  $9,4 \pm 0,1\%$  (Ullah et al. 2012). Seguidamente, o engaço de uva apresentou  $5,4 \pm 0,7\%$  de cera/gorduras removidas, valor semelhante, mas ligeiramente inferior ao da literatura, que indica  $8,16 \pm 0,01$  (Sousa et al. 2014). Por último, o carolo de milho, a folha de espiga de milho e a vagem de fava perderam quantidades semelhantes,  $2,6 \pm 0,9\%$ ,  $2,2 \pm 0,3\%$  e  $1,7 \pm 0,2\%$ , respetivamente, não apresentando diferenças significativas entre elas ( $p > 0,05$ ). Estes resultados também são semelhantes aos encontrados na literatura, onde é descrito que

o carolo de milho apresenta baixo teor de gordura,  $0,30\pm 0,02\%$  (Pointner et al. 2014), a folha da espiga do milho apresenta  $2,20\pm 0,11\%$  (Yeasmin e Mondal 2015) e nas sementes da fava se encontra uma percentagem média de gorduras de  $1,49\pm 0,05\%$  (Książak, Bojarszczuk, e Staniak 2018).

No passo II foi removida a lenhina presente nas amostras. Foi possível perceber que o carolo de milho, a folha de espiga de milho e o bagaço de medronho perderam  $21,2\pm 2,3\%$ ,  $20,2\pm 0,7\%$  e  $25,3\pm 1,1\%$  de massa, respetivamente. Apesar de apresentarem valores dentro da mesma gama, o carolo de milho e a folha de espiga de milho têm a mesma quantidade de lenhina ( $p > 0,05$ ), mas o bagaço de medronho é estatisticamente diferente das duas ( $p > 0,001$ ). Estudos indicam que, os primeiros dois possuem valores de lenhina inferiores aos encontrados, em torno de  $11,9\pm 2,3\%$  e  $8\pm 5\%$ , respetivamente (Mendes, Carlos Augusto de Carvalho Ferreira, Naiara Marinho Sgambato Furtado e de Sousa 2015; Pointner et al. 2014). Esta diferença pode ser resultado de uso de protocolos diferentes. Quanto ao bagaço de medronho, não são conhecidos valores de referência. Relativamente ao engaço de uva ( $36,7\pm 0,4\%$ ), os valores encontrados na literatura são similares aos encontrados na nossa matéria-prima. Amendola (2012a) indica que o teor de lenhina presente no engaço de uva é cerca de  $32,35\pm 0,31\%$ . Por sua vez, a vagem de fava, tem presente na sua constituição lenhina em concentrações diferentes, dependendo da sua origem, mas que variam entre  $7,6\%$  e  $11,6\%$  (Malushi et al. 2017). Contudo, com este protocolo a percentagem de lenhina removida foi de  $46,5\pm 2,6\%$ , muito superior aos valores de referência. Esta discrepância de valores poderá ser devido à fase de maturação da vagem ou ao método de extração da lenhina. Por fim, a casca de romã é o resíduo com maior teor de lenhina, com uma perda de  $62,4\pm 1,1\%$ . Alguns autores indicam que a casca da romã pode conter entre  $20,59\%$  e  $41,86\%$ , dependendo da espécie (Hasnaoui, Wathélet, e Jiménez-Araujo 2014), os quais ficam aquém dos valores obtidos neste trabalho. Este resultado pode dever-se ao protocolo utilizado, podendo este ser demasiado agressivo para a referida amostra, levando consigo outros componentes para além da lenhina. Para se poder afirmar, seria necessária uma caracterização mais aprofundada da amostra extraída.

O passo III corresponde à remoção das hemiceluloses presentes nas amostras. O gráfico demonstra que a folha de espiga de milho e o carolo de milho são as fontes com percentagens mais elevadas de hemicelulose, com uma porção de  $39,7\pm 0,70\%$  e  $29,8\pm 0,13\%$ , respetivamente. Alguns autores indicam que a percentagem de hemicelulose presente na folha de espiga de milho é muito semelhante à detetada na nossa amostra, referenciando  $37,5\pm 2,80\%$  (Mendes et al. 2015). Para o carolo de milho, a literatura referencia valores entre  $25$  e  $43\%$ , diferindo da espécie utilizada. O valor obtido neste trabalho encontra-se dentro deste intervalo, indicando que a extração da

hemicelulose foi eficiente (Silvério et al. 2013). A vagem de fava, o bagaço de medronho e o engaço de uva possuem valores de hemicelulose muito próximos,  $17\pm 0,7\%$ ,  $15,3\pm 1,7\%$  e  $13,4\pm 0,4\%$ , respetivamente. No entanto, a estatística diz-nos que, apesar de semelhantes, a quantidade de hemicelulose presente na vagem de fava e no engaço de uva são diferentes ( $p < 0,001$ ). Os valores de referência para o feijão da fava são de  $8,9\pm 0,3\%$  de teor de hemicelulose (Vidal-Valverde et al. 1998). Este valor encontra-se muito abaixo do encontrado, contudo, dado que a nossa matéria-prima é relativamente mais fibrosa que o feijão, poderá conter maior percentagem de hemiceluloses. Relativamente ao bagaço de medronho, não foram encontradas referências relativamente à hemicelulose, no entanto para o engaço de uva, Spigno, Pizzorno, e De Faveri (2008) indicam que a mesma apresenta  $14,93\pm 1,42\%$  de hemicelulose, valor este bastante aproximado ao obtido neste trabalho. A casca de romã apresentou um teor de hemicelulose de  $6,1\pm 0,4\%$ , o que torna esse resíduo o mais pobre em termos de conteúdo de hemiceluloses. Um estudo sugeriu que este resíduo contém cerca de  $8,1\pm 3,5\%$  de hemicelulose combinada com pectina (Pereira et al. 2016). A diferença dos valores teóricos e obtidos é reduzida e é facilmente justificada pela inclusão de pectinas na percentagem apresentada.

No tratamento ácido (etapa IV) obteve-se a celulose com maior grau de pureza. Como demonstrado no gráfico, o bagaço de medronho foi a matéria-prima onde houve maior eliminação de “impurezas” ( $31,5\pm 1,0\%$ ). Apesar de ser o mais elevado, o engaço de uva apresentou praticamente o mesmo valor,  $30,1\pm 0,6\%$ , o que demonstra que estas duas matérias têm o mesmo grau de impureza ( $p > 0,05$ ). A fonte que se segue a estas duas, é a folha de espiga de milho ( $24,2\pm 0,7\%$ ). Esta fonte apresenta um grau de impureza intermédio e diferente das restantes fontes ( $p < 0,05$ ). As restantes fontes apresentam os valores mais baixos de impurezas: vagem da fava ( $22,1\pm 1,1\%$ ); carolo de milho ( $20,8\pm 2,0\%$ ); e casca de romã ( $19,3\pm 0,9\%$ ). Quando comparadas, a vagem da fava e a casca de romã, a última apresenta menor quantidade de impurezas ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 3** - Análise estatística de cada matéria-prima nas diferentes etapas de extração.

Foi realizada uma ANOVA dupla (n=3).

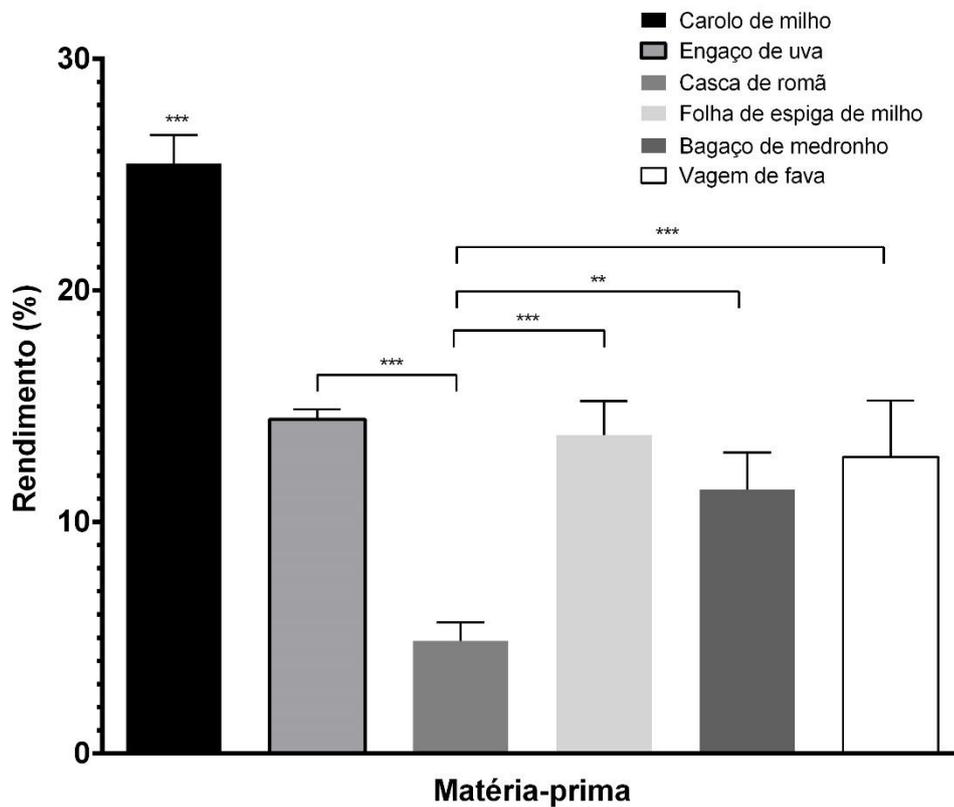
	Engaço de uva	Casca de romã	Folha de espiga de milho	Bagaço de medronho	Vagem de fava
<b>Etapa I</b>					
Carolo de milho	**	***	ns	***	ns
Engaço de uva		*	**	***	***
Casca de romã			***	***	***
Folha de espiga de milho				***	ns
Bagaço de medronho					***
<b>Etapa II</b>					
Carolo de milho	***	***	ns	***	***
Engaço de uva		***	***	***	***
Casca de romã			***	***	***
Folha de espiga de milho				***	***
Bagaço de medronho					***
<b>Etapa III</b>					
Carolo de milho	***	***	***	***	***
Engaço de uva		***	***	ns	***
Casca de romã			***	***	***
Folha de espiga de milho				***	***
Bagaço de medronho					ns
<b>Etapa IV</b>					
Carolo de milho	***	ns	***	***	ns
Engaço de uva		***	***	ns	***
Casca de romã			***	***	**
Folha de espiga de milho				***	*
Bagaço de medronho					***

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; ns  $p > 0,05$  (amostras estatisticamente iguais)

Após esta última etapa, a amostra restante corresponde à celulose purificada presente em cada fonte agroindustrial. Assim, a massa final foi avaliada de forma a perceber que quantidade de celulose será expectável encontrar nas fontes estudadas. Esta massa corresponde ao rendimento de todo o processo de extração e purificação.

Na **Figura 14** apresenta-se o rendimento global de extração de celulose para cada agrossíduo utilizado (n=3). O carolo de milho apresentou o maior rendimento de extração de celulose com  $26 \pm 1,2\%$ . No entanto, outros estudos relataram valores ligeiramente mais elevados de celulose para esta matéria-prima, entre 30 e 40%, podendo esta diferença ser negligenciada (M. Li et al. 2014; Pointner et al. 2014; Silvério et al. 2013). Já para o engaço de uva, o rendimento de extração de celulose diminuiu para  $14,4 \pm 0,43\%$ . Spigno, Pizzorno e De Faveri (2008) referiram valores bastante superiores, entre 25 e 38%, variando consoante o método de extração usado. Também Sousa et al. (2014) indicaram a presença de 30,3% de celulose nas suas amostras. Apesar destas referências referirem rendimentos superiores relativamente ao obtido no presente estudo, Amendola (2012) apresentaram resultados de 12,19%, valor similar ao apresentado. Esta

variabilidade de resultados advirá da aplicação de diferentes métodos de extração ou até da utilização diferentes variedades de espécies. Da folha de espiga de milho obteve-se um teor celulósico semelhante ao da vagem de fava,  $13,8 \pm 1,5\%$  e  $12,8 \pm 2,4\%$ , respetivamente. Na literatura, os valores referenciados para a espiga de milho são bastante superiores e rondam os 30-45% (C. A. D. C. Mendes et al. 2015; C. A. de C. Mendes et al. 2015; Yeasmin e Mondal 2015). Contudo, para a casca de fava, Vidal-Valverde et al. (1998) indicaram a presença de  $8,33 \pm 0,28\%$  de celulose, manifestamente mais baixo comparativamente ao resultado obtido. Em relação ao bagaço de medronho, Özcan e Hacisferogullan (2007a) referem que  $6,4 \pm 1,10\%$  é celulose bruta, valor significativamente inferior aos  $11,4 \pm 1,6\%$  apresentados na nossa amostra. Por fim, o rendimento para a extração de celulose purificada a partir de casca de romã foi na ordem dos  $4,8 \pm 0,8\%$ , o que é inferior aos  $7,9 \pm 1,8\%$  de referência, mas que se encontra na mesma ordem de grandeza (Pereira et al. 2016).



**Figura 14** - Rendimento global de extração de celulose para cada matéria-prima estudada. Foi realizada uma ANOVA simples ( $n=3$ ). Amostras significativamente diferentes para  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*).

No geral, o melhor rendimento da extração de celulose foi obtido a partir do carolo de milho (com um coeficiente de variação inferior a 5%,  $p < 0,001$ ). O resíduo que se revelou menos interessante para a extração de celulose foi a casca de romã. Este difere de todas

as outras matérias ( $p < 0,001$ ), sendo ligeiramente mais semelhante ao bagaço de medronho ( $p < 0,01$ ). Esse menor rendimento é consequência do alto teor de lenhina que estará presente na casca de romã, e que foi removido na etapa II, correspondendo a cerca de 60% do seu peso total.

Relativamente às restantes celulosas, folha de espiga de milho, bagaço de medronho e vagem de fava, não são encontradas diferenças entre si ( $p > 0,05$ ).

### 3.2 Caracterização da celulose extraída dos vários agroresíduos

---

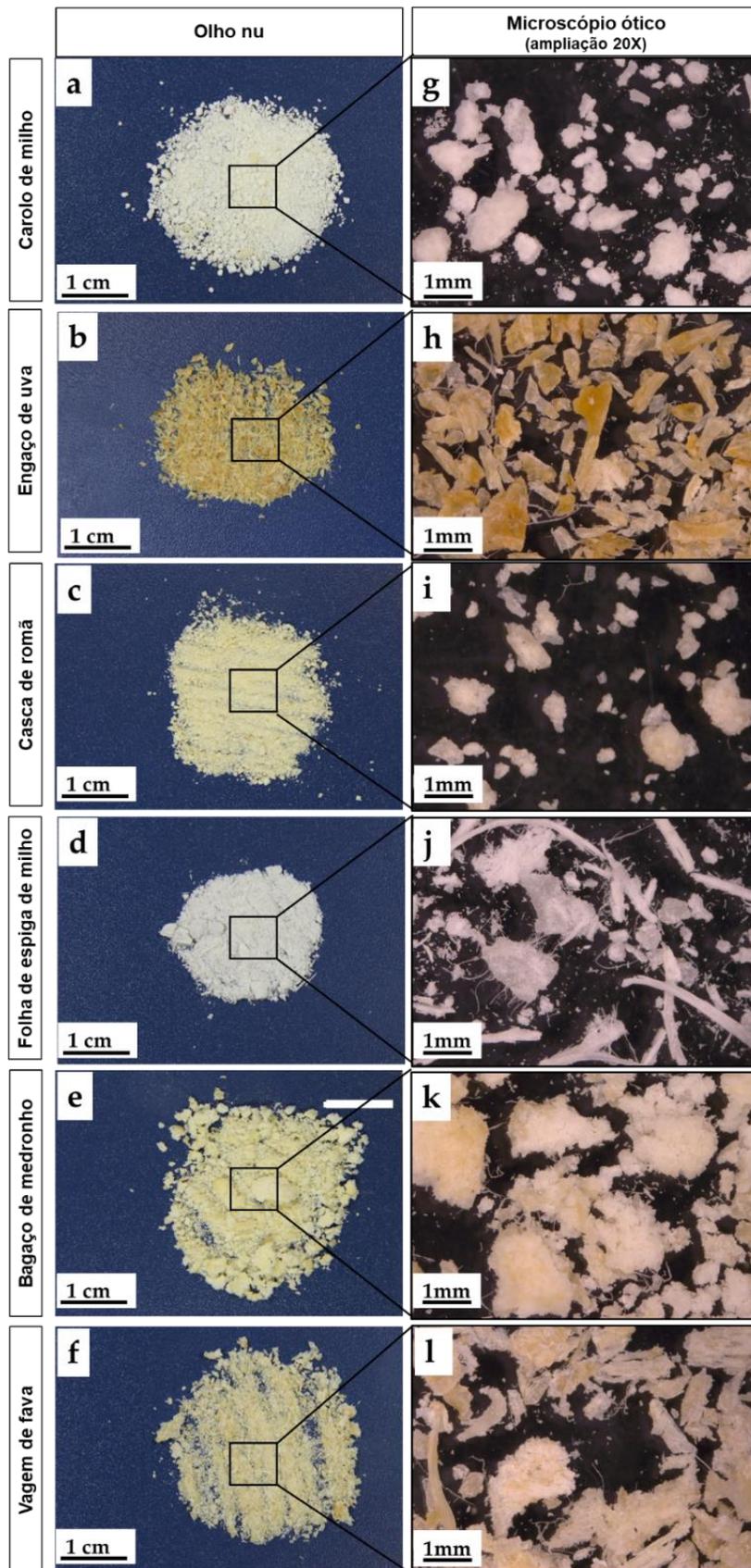
A partir das celulosas obtidas, a fase seguinte consistiu na sua caracterização. Foi realizada uma observação a olho nu e ao microscópio, de forma a interpretar diferenças morfológicas entre as celulosas. Também foram analisadas quimicamente por (FTIR) e termicamente por (TGA/DSC).

Relativamente ao aspeto macroscópico das celulosas das diferentes proveniências (**Figura 15 a-f**), a característica mais evidente é a coloração. Poderá ser atribuída uma ordem, do mais amarelado para o mais branco da seguinte forma: engaço de uva, bagaço de medronho, casca de romã, vagem de fava, carolo de milho e folha de espiga do milho. Esta diferença sugere que o engaço de uva é bastante mais pigmentado que as restantes matérias, uma vez que, mesmo sofrendo uma etapa de branqueamento, não perde parte da sua coloração. A celulose de carolo de milho (a), engaço de uva (b), casca de romã (c) e vagem de fava (f) apresentam um aspeto mais homogéneo relativamente às restantes, sendo que na celulose de bagaço de medronho (e) é onde é mais notória a discrepância relativamente ao tamanho dos grãos. Entre todas estas a vagem de fava é a que apresenta uma granulometria mais uniforme. O aspeto mais ou menos granulado das celulosas deve-se principalmente ao seu comportamento na última etapa de extração, por exemplo, a folha de espiga de milho (d) ficou totalmente colada à placa de petri após a secagem, sendo de difícil remoção, ficando mais moída e assim com um aspeto mais de pó. Por outro lado, a celulose de engaço de uva (b) foi a de mais fácil remoção, apresentando-se mais granulado.

Para uma compreensão mais aprofundada das celulosas obtidas, realizou-se a sua observação por microscopia (**Figura 15 g-l**). É possível observar que a celulose de engaço de uva (h) apresenta-se mais cristalina que as restantes, com uma grande variedade de formas e tonalidades de amarelo. Já os grãos de celulose de vagem de fava (l) demonstram ser planos e com grandes diferenças de granulometria. Por outro lado, as celulosas de carolo de milho (g) e casca de romã (i), apresentam uma forma mais

arredondada, característico da aglomeração de várias partículas. No entanto, estas duas celulosas têm menos grãos que todas as outras celulosas, ou seja, o aglomerado de partículas é maior nestas celulosas. Quanto ao aspeto da celulose de bagaço de medronho (k) é muito similar às duas celulosas citadas anteriormente, no entanto o seu tamanho é significativamente maior. Por último, a celulose de folha de espiga de milho (j) é a que apresenta um grão mais peculiar. É possível observar dois tipos de formas, um arredondado, semelhante à casca de romã, e outro mais longitudinal, fazendo lembrar um aspeto fibroso. Este último poderá ser o motivo desta celulose ser de tão difícil remoção após a secagem na última etapa.

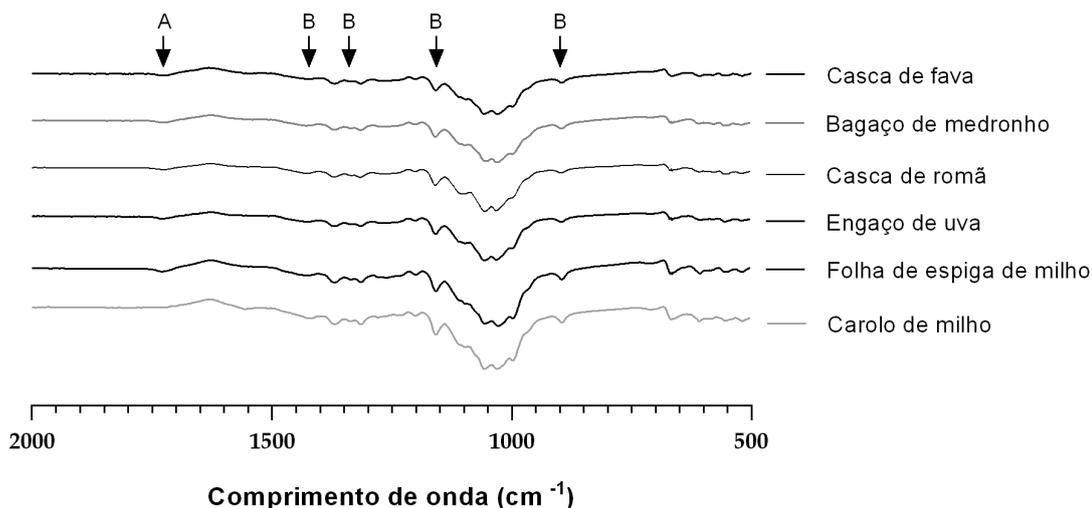
As diferentes variedades de grão encontrados nestas amostras, demonstram uma grande variabilidade nas celulosas, diferindo da matéria-prima da qual foram extraídas. Os diferentes tamanhos de grãos observados poderão ser indicativos de diferentes tempos de dispersão, uma vez que grãos de maior tamanho são mais difíceis de dissolver e, por sua vez, de manipular. Uma vez que o principal objetivo destas celulosas será a sua aplicação em *scaffolds*, passando pela sua extrusão em forma de filamento, a escolha mais acertada passa pelas que apresentam um grão mais uniforme e de menor dimensão, como é o caso do carolo de milho e da casca de romã.



**Figura 15** - Imagens a olho nu (a, b, c, d, e, f) e microscópicas (ampliação 20X) (g, h, i, j, k, l) das celulosas extraídas

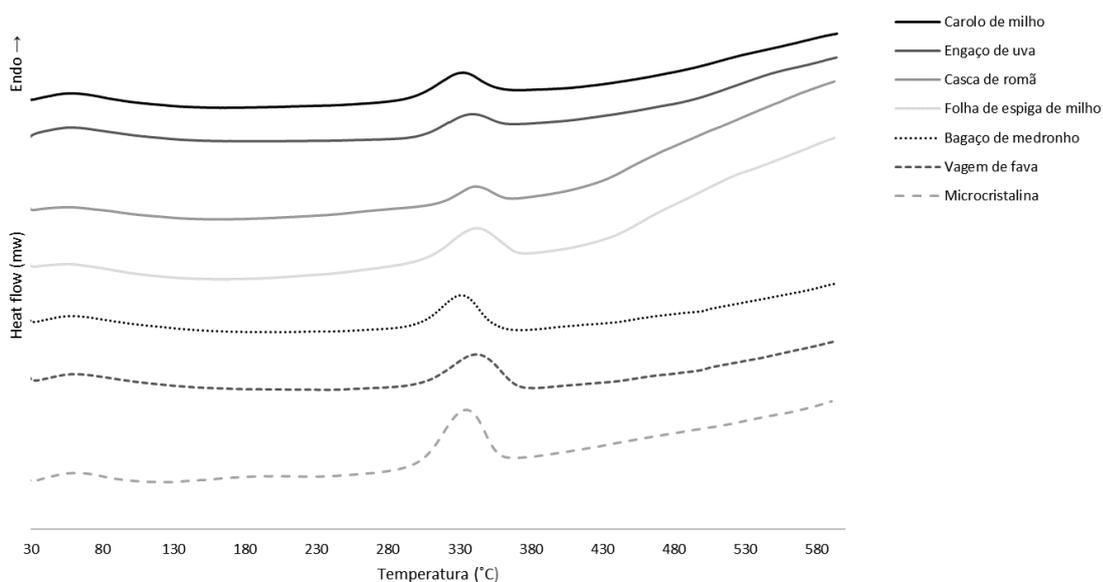
Por FTIR (**Figura 16**), espectro entre  $500\text{ cm}^{-1}$  e  $2000\text{ cm}^{-1}$ , é possível verificar os grupos químicos presentes nas várias amostras de celulose. Após análise é possível verificar que os seis espectros são muito semelhantes e mostram picos característicos da celulose (Q. Liu et al. 2008). Segundo a literatura, as bandas características da lenhina encontram-se a  $1610\text{-}1595\text{ cm}^{-1}$  e  $1510\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à elongação C=C do anel aromático, e ainda a  $1465\text{ cm}^{-1}$  correspondendo à dobra assimétrica do  $\text{CH}_3$  (Colom et al. 2003). Essas bandas não são visíveis em nenhum dos espectros, indicando que toda a lenhina foi removida com sucesso na etapa II do processo de extração. A hemicelulose é composta essencialmente por monómeros de açúcar e ácido acético. O ácido acético, por sua vez, é detetável entre os  $1729\text{ cm}^{-1}$  e  $1740\text{ cm}^{-1}$ , através da elongação do acetil ou do ácido carboxílico (Colom et al. 2003; Hasan, Zaki, e Pasupulety 2003). Nestes espectros, à exceção do carolo de milho, é visível uma banda na região dos  $1730\text{ cm}^{-1}$ (A). Assim, confirma-se a presença de ácido acético nas amostras, o que indica que a etapa III da extração não foi suficientemente eficaz para remover toda a hemicelulose presente. No entanto, o facto das bandas serem de baixa transmitância indica que a hemicelulose se encontra em baixa concentração. No caso do carolo de milho, provavelmente a hemicelulose encontrava-se mais acessível tornando a sua remoção mais fácil, quando comparado com as outras matérias-primas. O seu espectro apresenta bandas típicas da presença de celulose (B), mais especificamente a  $1426\text{ cm}^{-1}$ ,  $1335\text{ cm}^{-1}$  e  $1158\text{-}1162\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à dobra do  $\text{CH}_2$ , à dobra plana no OH e à elongação assimétrica da ponte C-O-C, respetivamente. Existe ainda outra banda a  $898\text{ cm}^{-1}$  correspondente à elongação assimétrica fora da fase de anel da celulose (Colom et al. 2003). Todas estas bandas estão presentes em todas as amostras analisadas.

Estes resultados confirmam a obtenção da celulose, não contendo nenhum vestígio de lenhina, após o processo de extração e purificação. Contudo, a remoção da hemicelulose não foi totalmente eficaz, à exceção do carolo de milho que representa a amostra mais pura do leque de amostras testadas, devido à ausência do pico a  $1730\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 16** - Espectro de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das celulosas obtidas. A- Banda característica da hemicelulose; B- Banda característica da celulose

Para compreender o comportamento deste polímero com o aumento controlado da temperatura, foi realizada a análise termogravimétrica (TGA) e de calorimetria diferencial de varrimento (DSC). Os termogramas obtidos da análise de DSC encontram-se na **Figura 17** e os valores retirados da análise termogravimétrica apresentam-se na **Tabela 4**. Como forma de validação e comparação dos resultados, foi feita a análise a celulose microcristalina, disponível comercialmente.



**Figura 17** - Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) das amostras de 6 fontes de celulose de agroresíduos e da celulose microcristalina (controle).

**Tabela 4** – Análise de calorimetria diferencial de varrimento (DSC) para as amostras de 6 fontes de celulose de agroresíduos. Foi realizada uma ANOVA dupla (n=3). Amostras significativamente diferentes para  $p<0,05$  (\*) e  $p<0,001$  (\*\*\*)

<b>Celulose</b>	<b>Perda H<sub>2</sub>O (%)</b>	<b>PM (%)</b>	<b>T<sub>onset</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>d</sub> (°C)</b>
Carolo de milho	5,19±0,29	82,14±1,47	307,17±1,60	330,31±0,19
Engaço de uva	5,29±0,37	81,97±1,66	306,38±0,53	330,79±0,74
Casca de romã	4,11±0,24*	80,05±0,44	311,24±0,62	333,65±0,32
Folha de espiga de milho	4,98±0,19	84,83±1,42	316,69±1,34	339,40±0,43
Bagaço de medronho	4,69±0,17	82,73±0,25	309,11±0,34	329,62±0,09
Vagem de fava	4,95±0,11	86,71±0,63	314,02±0,89	339,65±0,73
Microcristalina	5,61±0,11	91,15±0,47***	312,24±0,58	332,50±0,46

PM – Perda de massa total; T<sub>d</sub> – Temperatura de degradação

As amostras, em média, perderam cerca de 5% do seu peso inicial até aos 120 °C, que se atribui à água presente nas amostras, ou seja, à água que não foi totalmente removida no último processo de secagem. Segundo Azubuike e Okhamafe (2012), a celulose microcristalina apresenta cerca de 5,30% de humidade. De acordo com os resultados obtidos, a única amostra que apresenta uma perda de água estatisticamente menor que a microcristalina (5,61±0,11%), é a casca de romã (4,11±0,24%) ( $p<0,05$ ). O mesmo autor ainda indica que, no que diz respeito à celulose microcristalina, a 550 °C, a massa perdida ronda os 97%. Neste caso, as amostras foram aquecidas até aos 600 °C, percebendo-se que em nenhuma das celulosas analisadas há degradação total, restando sempre entre 14 a 20% de matéria no cadinho. Estes valores de massa finais encontram-se dentro dos valores referenciados para celulosas (Nada e Hassan 2000). No caso da celulose microcristalina, podemos constatar que no fim do ciclo de aquecimento só restam aproximadamente 9% de material, demonstrando que esta celulose apresenta maior grau de degradação térmica face às celulosas de origem agroindustrial quando sujeita ao mesmo programa de temperatura ( $p<0,001$ ). Isto pode ser um aspeto bastante relevante no caso das celulosas alternativas a quando da sua utilização na produção de biomateriais por técnicas que requerem temperaturas de fabricação mais elevadas. As diferenças de perda de massa total, em relação à literatura, podem dever-se ao lote usado e aos constituintes residuais presentes nas amostras.

O valor em que a celulose microcristalina inicia a sua degradação ronda os 303 °C (Kale, Bansal, e Gorade 2018), cerca de 9 °C abaixo do valor estimado para o nosso lote (312,24±0,58 °C). Os termogramas revelaram  $T_{\text{onset}}$  muito próximos para o carolo de milho e para o engaço de uva, demonstrando uma possível semelhança entre estas celulosas. A celulose que inicia a sua degradação mais tardiamente, em relação às outras celulosas é a de folha de espiga de milho, nos 316,69±1,34 °C. Quando comparadas com a celulose microcristalina, a casca de romã é a única fonte que apresenta uma  $T_{\text{onset}}$  igual ( $p>0,05$ ). A degradação completa das celulosas ocorre entre os 330 °C e os 340 °C, o que coincide com os valores disponíveis na literatura para a celulose proveniente de madeira (Morán et al. 2008).

Deste modo, poder-se-á concluir que à exceção da casca de romã, todas as outras celulosas não diferem entre si, o que indica que as restantes poderão dar continuidade a trabalho futuro, uma vez que se equiparam à celulose proveniente de madeira.

### 3.3 Caracterização dos *scaffolds*

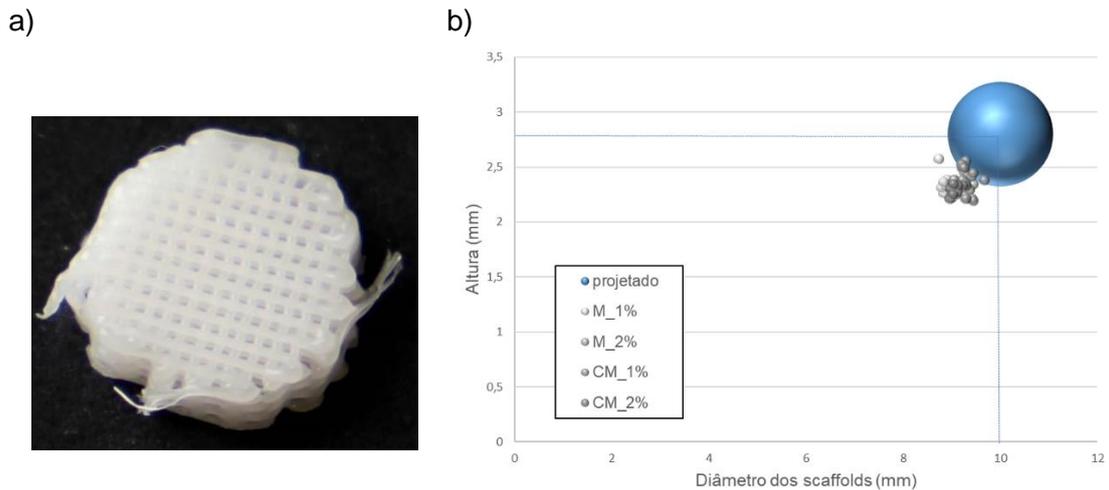
---

Como projetado, todos os *scaffolds* produzidos apresentam forma aproximadamente cilíndrica (**Figura 18a**), facilitando deste modo a sua incorporação no joelho, uma vez que a broca utilizada para a perfuração, na operação, apresenta forma circular. Tal como mencionado na secção 2.3.2, o *scaffold* final deve apresentar as seguintes características: secção transversal com diâmetro de 10 mm; diâmetro de fibra de 300 µm e 10 camadas.

A análise morfológica dos *scaffolds* produzidos foi feita através da observação a olho nu, por microscopia ótica e por MicroCT (**Figura 19**). A olho nu é possível observar uma rede “perfeita”, não se encontrando diferenças significativas entre os vários *scaffolds* produzidos com diferentes celulosas e concentrações. As dimensões de todas as amostras (diâmetro e altura) foram devidamente medidas com recurso a um paquímetro. Os *scaffolds* apresentaram um diâmetro entre 8-9 mm e alturas que variam entre 2,2-2,5 mm (**Figura 18b**). Todos os *scaffolds* apresentam 10 camadas de filamentos. As restantes dimensões foram avaliadas pelas outras técnicas já referidas.

As diferenças que se verificaram entre o projetado e o real deve-se ao processo de produção. O PCL é aquecido acima da sua temperatura de fusão (de forma a obter-se uma pasta viscosa), para depois ser extrudido camada-a-camada. As diferenças de temperatura a que o material é sujeito fazem com que ao passar do estado líquido para sólido sofra alguma contração, o que justifica esta diferença entre as dimensões previstas e as do *scaffold* obtido. No que diz respeito à pequena diferença verificada entre os

valores da altura das estruturas, também é facilmente justificada. Idealmente, as camadas seriam tangentes entre si, apresentando uma geometria de filamento circular perfeito de 300  $\mu\text{m}$ . No entanto, na prática e de forma a assegurar a adesão entre as camadas, o incremento em Z não é de 300  $\mu\text{m}$ , mas sim de 280  $\mu\text{m}$  (~ -7% da altura total). Mais uma vez, a contração do material na passagem leva a que esta altura ainda reduza ligeiramente.



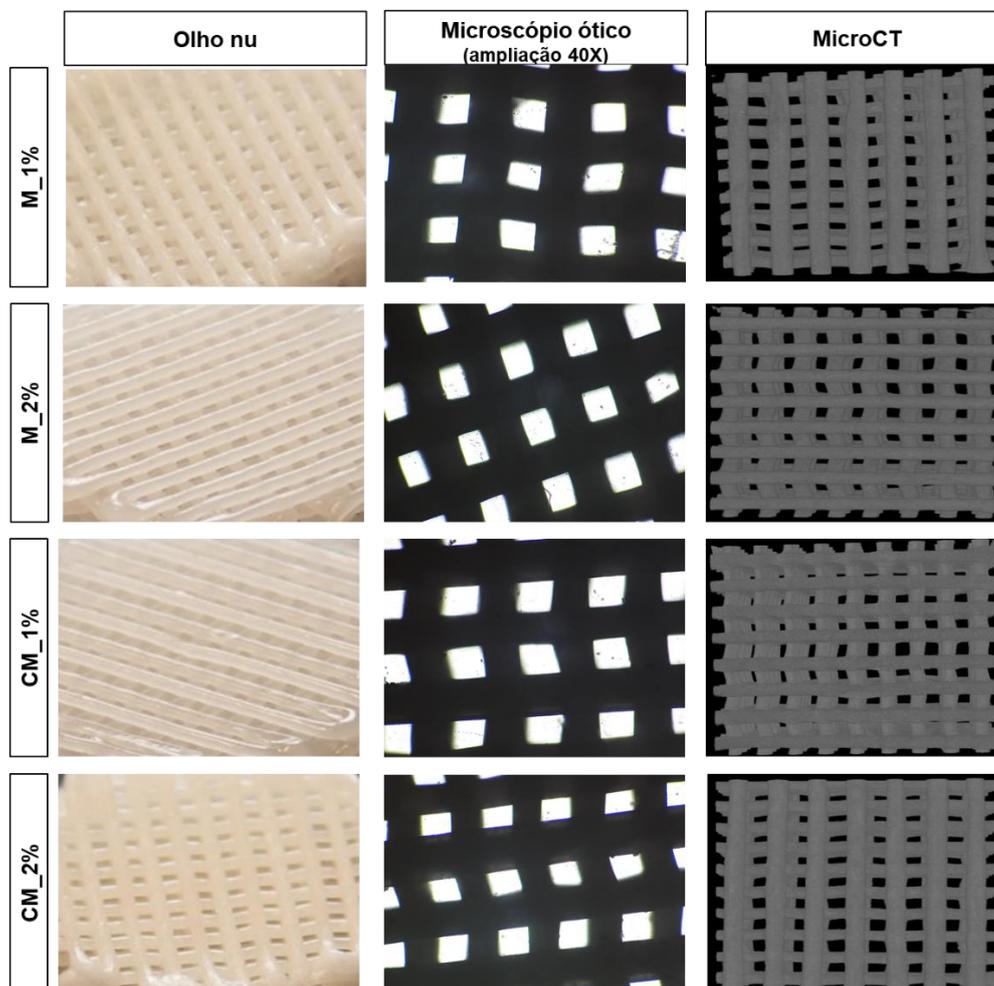
**Figura 18** - *Scaffolds* de policaprolactona (PCL) produzida por extrusão na Bioextruder.

a) exemplo de uma amostra produzida; b) comparação entre as dimensões projetadas e as dimensões obtidas.

Utilizando a técnica de microscopia ótica com uma ampliação de 40X é possível observar em maior detalhe a última camada do *scaffold*, que nos fornece indicações mais detalhadas sobre os filamentos, tais como as suas dimensões e também dos poros. Assim, é possível verificar que tanto os poros como os filamentos apresentam as dimensões desejadas para a proliferação celular, ~300  $\mu\text{m}$  de poro e de diâmetro do filamento. Os condrócitos apresentam preferências por matrizes com poros de maiores dimensões para se conseguirem desenvolver, poros com tamanhos entre os 200  $\mu\text{m}$  e os 405  $\mu\text{m}$  (Naseri et al. 2016; Oh et al. 2007). Estudos desenvolvidos com diferentes dimensões de poros no mesmo *scaffold*, indicam que a adesão dos condrócitos é maior no centro do *scaffolds*, onde a dimensão do poro é 390  $\mu\text{m}$  (C. S. Moura, Ferreira, e Bártolo 2016). Assim, as dimensões dos *scaffolds* produzidos encontra-se na região ideal para a proliferação e adesão dos condrócitos.

As imagens de MicroCT demonstraram homogeneidade em todas as amostras, não sendo detetados aglomerados de celulose dispersos pelos *scaffolds*, tanto na celulose microcristalina, como na celulose de carolo de milho. Este resultado é indicativo de que a

celulose poderá estar bem dispersa e integrada na matriz de PCL, ou por outro lado, o MicroCT não consegue mostrar a celulose presente nas matrizes, uma vez que este apresenta baixa resolução.



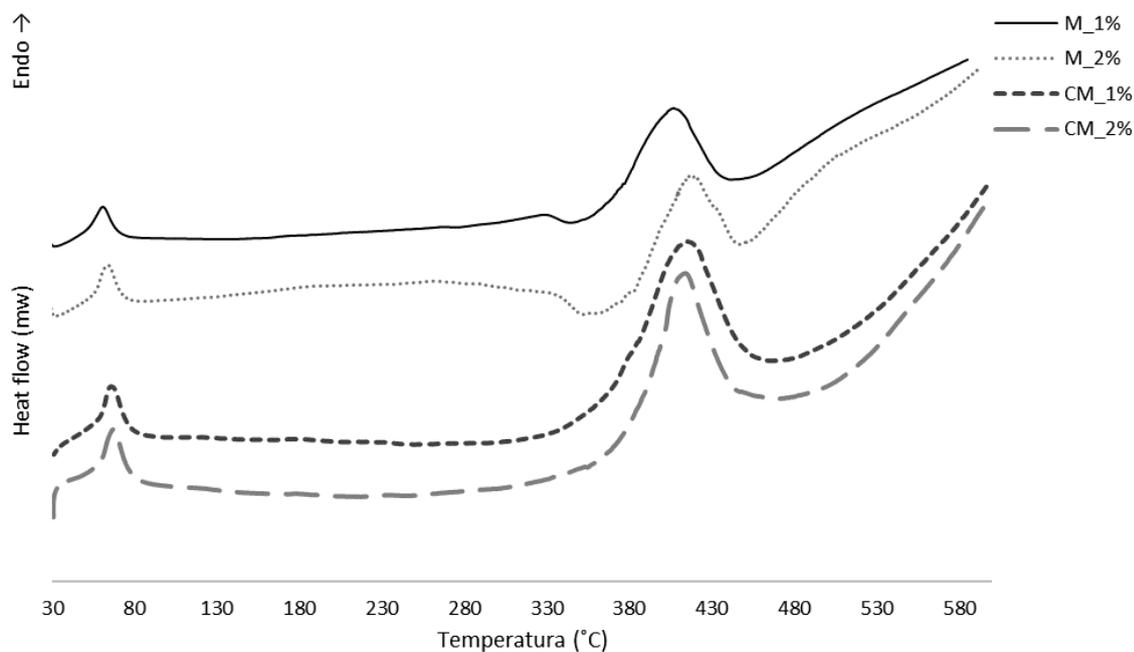
**Figura 19** - Morfologia das scaffolds de (PCL+ celulose) a olho nu, microscopia ótica (ampliação 40X) e microtomografia computadorizada (MicroCT).

A porosidade de cada amostra é muito semelhante entre si variando entre 49 e 54% (**Tabela 5**). É possível verificar que com o aumento da concentração de celulose, em ambos os casos, a porosidade do *scaffold* também aumenta, indicando que a inclusão de celulose confere porosidade ao material, tal como indicado noutros estudos (M. E. Alemán-Domínguez et al. 2018). Contudo, os valores de porosidade obtidos encontram-se abaixo dos valores do tecido nativo, conferindo pouca superfície de contacto para o crescimento celular. Por outro lado, pode-se afirmar que fornece um forte suporte para a sustentação de cargas, essencial para a aplicação no joelho (Slivka et al. 2001). Todas as amostras apresentaram percentagens de interconectividade de aproximadamente 100%, indicando que as células poderão migrar livremente por todo o *scaffold*.

**Tabela 5** - Porosidade dos *scaffolds* de PCL e celulose, calculada através de MicroCT.

<b>Scaffold de PCL + celulose</b>	<b>Porosidade (%)</b>	<b>Interconectividade entre poros (%)</b>
M_1%	49,14	99,999
M_2%	53,71	99,997
CM_1%	50,67	100,00
CM_2%	54,24	99,999

A análise térmica aos *scaffolds* foi feita através da observação dos gráficos de DSC realizados às amostras (**Figura 20**). Através desta análise é possível observar dois picos aproximadamente a 64 °C e a 412 °C para todas as amostras. Conclui-se que nestas amostras está presente única e exclusivamente a PCL, uma vez que estas são as suas temperaturas de fusão e degradação, respetivamente. Se a celulose estivesse presente, seria visível um pico na temperatura de degradação da celulose, ou seja, próximo dos 300 °C. Desta forma, estes termogramas dão indicações de duas situações: a celulose não ficou bem dispersa e a amostra analisada poderia não conter nenhum vestígio de celulose, ou o rácio da corrida, 10 °C/min, é demasiado rápido para a quantidade de celulose presente na amostra, não tendo capacidade de captar e registar a presença das celulosas nas amostras. De forma a garantir a presença e dispersão homogénea da celulose na matriz de PCL, estes dois devem ser ligados quimicamente. Esta ligação, para além das vantagens mencionadas, torna igualmente a cadeia final mais consolidada e, conseqüentemente, mais resistente. Assim, o próximo passo passará pela otimização da funcionalização da PCL para posterior introdução da celulose e avaliar as diferenças em relação aos *scaffolds* já obtidos (mistura física).



**Figura 20** - Termogramas obtidos por DSC para os *scaffolds* de PCL e celulose (microcristalina e de carolo de milho) (n=3).

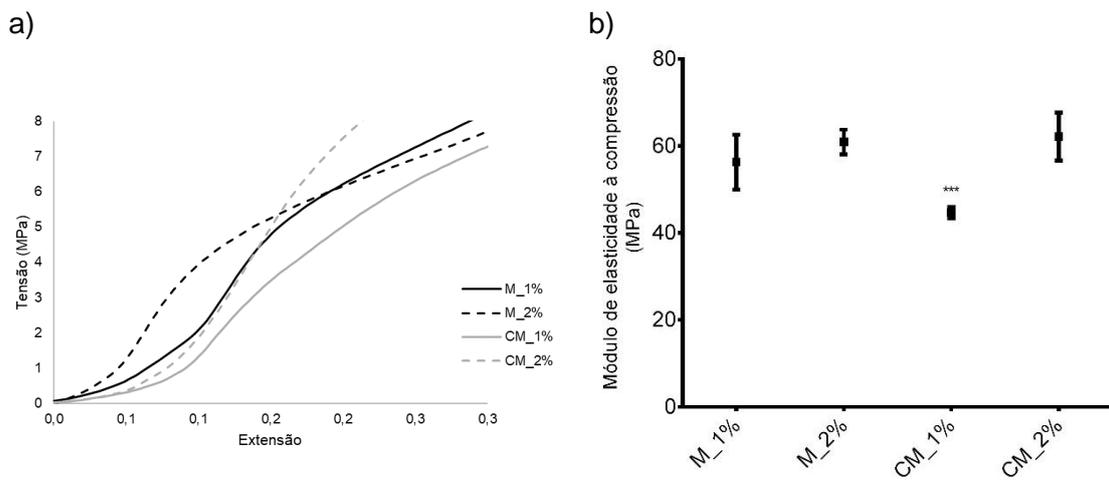
O comportamento mecânico das amostras foi avaliado à compressão, visto que as amostras estão pensadas para substitutos de cartilagem articular e estas estão sujeitas maioritariamente a forças de compressão. A curva tensão-extensão (**Figura 21a**) demonstra o comportamento tipo do material em estudo. O cálculo do módulo de elasticidade à compressão é essencial para compreender se o *scaffold* poderá ser aplicado na zona de interesse de forma a se equiparar ao tecido a regenerar, e se suportará as forças exercidas nesse local. Neste caso, o objetivo é implementar estes *scaffolds* no joelho, cujos valores do módulo de compressão para a cartilagem humana se encontra entre 5,5 e 11,8 MPa (Shepherd 1999).

Todas as curvas, à exceção da microcristalina 2%, apresentam o mesmo comportamento, no entanto, a região de interesse encontra-se dentro dos mesmos limites de tensão que as restantes curvas. Esta região corresponde à fase inicial da curva, que diz respeito ao comportamento elástico do material, enquanto a fase seguinte diz respeito ao comportamento plástico. Assim, a fase avaliada de forma a retirar valores dos módulos de elasticidade, foi a primeira.

Através da análise dos módulos de elasticidade à compressão (**Figura 21b**) verifica-se que a incorporação de 1% ou 2% de celulose microcristalina, não se traduz numa melhoria das suas propriedades ( $56 \pm 6,3$  e  $61 \pm 2,8$  MPa, respetivamente) ( $p > 0,05$ ). Se se comparar os resultados das duas fontes de celulose a 1%, verifica-se que da microcristalina para o carolo do milho há um decréscimo significativo de cerca de 21%

( $45 \pm 1,3$  MPa,  $p < 0,001$ ). Contudo, se se elevar a percentagem de celulose para 2% nas duas fontes, estas apresentam valores estatisticamente iguais ( $61 \pm 2,8$  MPa para a microcristalina e  $62 \pm 5,5$  MPa para o carolo do milho). Se se comparar os resultados obtidos no carolo do milho com 1% e 2%, verifica-se um aumento de cerca de 40% ( $p < 0,001$ ).

De um modo geral, pode-se afirmar que os resultados obtidos com celulose proveniente do carolo do milho (2%) conferem propriedades mecânicas iguais às da microcristalina, funcionando assim como um bom substituto à mesma.

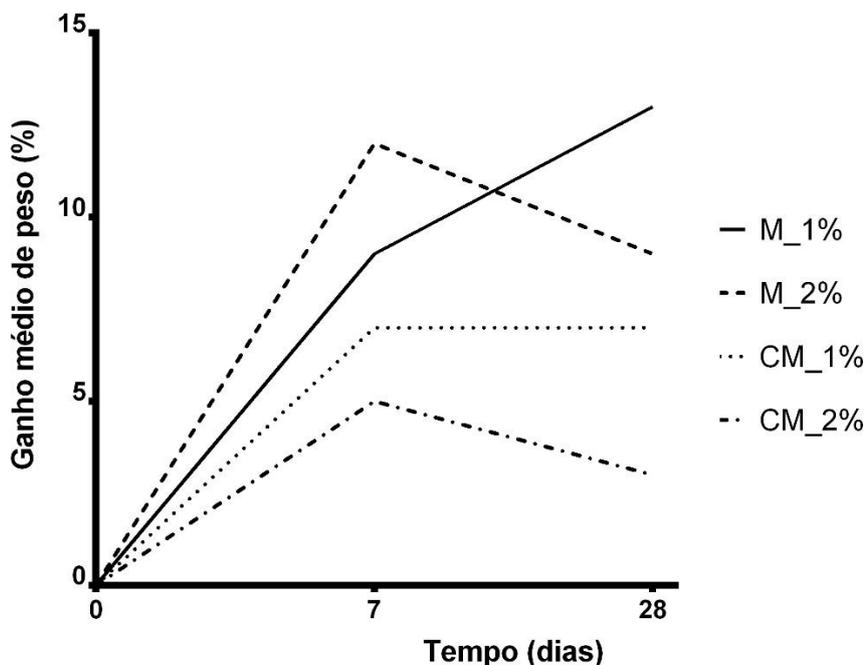


**Figura 21** – Propriedades mecânicas dos *scaffolds* de PCL e celulose (microcristalina e carolo de milho) ( $n=5$ ): a) curvas tensão-extensão; b) módulos de elasticidade à compressão. Foi realizada uma ANOVA simples ( $n=5$ ). Amostras significativamente diferentes para  $p < 0,001$  (\*\*\*).

Aquando a ocorrência de situações traumáticas, de artrite reumatoide ou artroses os níveis de lisozima presentes da cartilagem articular aumentam, conforme reportado na literatura (Greenwald et al. 1972). Este mesmo autor referencia que a concentração média encontrada na cartilagem articular do joelho, nessas situações, é aproximadamente  $1,31 \mu\text{g}/\text{mg}$  de cartilagem. Por esta razão, é importante avaliar o comportamento dos *scaffolds* produzidos em contacto com a enzima. Desta forma, planeou-se uma experiência de degradação enzimática ( $2 \text{ mg}/\text{mL}$  de meio PBS) durante 28 dias.

No decorrer dos ensaios enzimáticos foi possível avaliar a massa dos *scaffolds* das diferentes amostras em tempos específicos pré-determinados (dia 7 e 28, por outras palavras, decorrido 1 semana e 1 mês de experiência, respetivamente) (**Figura 22**). Os resultados obtidos foram comparados aos obtidos no dia 0. Em todas as amostras é possível verificar que houve um aumento da massa do *scaffold* ao 7º dia, em que a amostra que apresentou um menor ganho médio foi a do carolo de milho a 2% (5%) e a que apresentou um ganho médio maior foi a de 2% de celulose microcristalina (12%). A

potencialmente esperada degradação do material, levaria a uma perda global de massa, o que não se verificou, conforme mencionada acima. Isto pode dever-se ao facto da celulose, sendo um polímero constituído por grupos de glicose, apresentar propriedades hidrofílicas, ou seja, capta com relativa facilidade a água presente no meio PBS (Carpenter, de Lannoy, e Wiesner 2015; George e Sabapathi 2015).

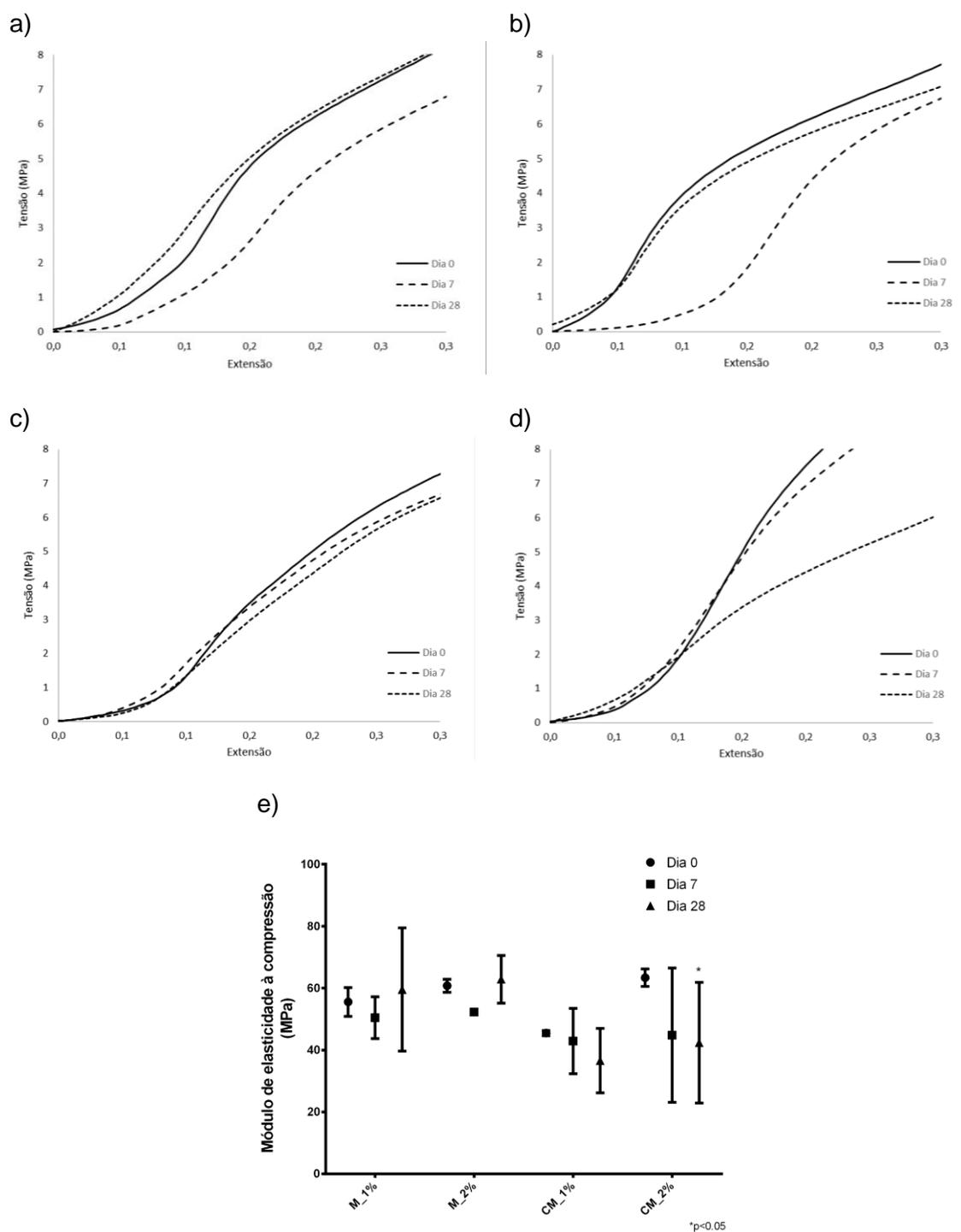


**Figura 22** - Evolução da massa dos *scaffolds* expostos a degradação enzimática com lisozima aos dias 0, 7 e 28 (n=3, por condição, por dia de avaliação).

Já nas restantes amostras a massa dos *scaffolds* baixou ou estabilizou, como é o caso dos *scaffolds* com celulose de carolo de milho a 1%. Da primeira para a quarta semana de experiência é possível concluir que se começa a notar o efeito da degradação do *scaffold*, não havendo certezas de qual o dia em que as enzimas iniciaram esta degradação. Assim, no futuro, terá de se avaliar o que acontece no decorrer deste intervalo de tempo.

Analisando também a forma como a lisozima afeta as propriedades mecânicas dos *scaffolds*, foram realizados testes à compressão no decorrer da experiência, ao 7º e ao 28º dia (**Figura 23**). O espectável seria que a lisozima afetasse, de alguma forma, a estrutura da matriz, degradando os polímeros que a constituem e, por conseguinte, seria visível um decréscimo das propriedades mecânicas ao longo do tempo. Na **Figura 23a-d**, estão representadas as curvas tensão-extensão correspondentes aos *scaffolds* produzidos, e todas apresentam comportamento característico de polímeros termoplásticos.

O módulo de elasticidade é visível na **Figura 23e**, e registou-se um decréscimo das propriedades mecânicas em todas as amostras após 7 dias de ensaio, contudo quando observado o módulo de elasticidade ao 28º dia para os *scaffolds* produzidos com celulose microcristalina, é visível um aumento. No entanto, esta diferença não é significativa ( $p>0,05$ ). Relativamente aos *scaffolds* constituídos por celulose de carolo de milho, é visível um decréscimo das suas propriedades mecânicas, que só se demonstra significativo no *scaffolds* com 2% ( $p<0,05$ ), demonstrando que este apresenta uma diminuição considerável em relação aos restantes *scaffolds*, provando que houve degradação da sua estrutura quando sujeito à lisozima. Esta degradação não representa um impacto negativo, pois os valores ainda conseguem fazer face aos requisitos mínimos impostos aquando a aplicações de cargas de compressão. Esta degradação, provavelmente ocorreu ao nível da celulose e não da PCL, uma vez que este polímero apresenta uma degradação muito lenta, aproximadamente 1% ao fim de 10 semanas, no mesmo meio com a mesma enzima (Wan et al. 2008).



**Figura 23** – Propriedades mecânicas dos *scaffolds* de PCL e celulose (microcristalina e carolo de milho) em ensaios de degradação com lisozima (n=3): a) curva tensão-extensão de M\_1%; b) curva tensão-extensão M\_2%; curva tensão-extensão CM\_1%; curva tensão-extensão CM\_2%; e) módulos de elasticidade à compressão. Foi realizada uma ANOVA dupla (n=5). Amostras significativamente diferentes para  $p < 0,05$  (\*).

## Capítulo 4 Conclusão

---

A utilização da celulose para as mais diversas aplicações tem vindo a aumentar ao longo do tempo. Para a sua obtenção, a exploração da madeira tem-se intensificado levando, conseqüentemente, a um aumento da desflorestação e do impacto ambiental desta atividade. Desta forma, a procura de soluções mais sustentáveis tem ganho maior destaque. Este trabalho surge como resposta a essa necessidade, através da exploração de agrosíduos de diferentes fontes, nomeadamente, carolo de milho, engaço de uva, folha de espiga de milho, casca de romã, bagaço de medronho e vagem de fava.

Após a extração e purificação das celuloses, avaliaram-se os seus rendimentos, verificando-se que o carolo de milho é o que revelou um valor mais elevado. Da caracterização morfológica e físico-química das celuloses, usando como controlo a celulose microcristalina, pois é a mais utilizada na produção de *scaffolds* na área biomédica constatou-se que morfológicamente, as mais apropriadas seriam as que apresentassem um grão muito fino e cor branca (o mais aproximado ao controlo). Os resultados demonstram que os melhores resíduos são o bagaço de medronho e o carolo de milho. Quanto à análise por FTIR, foi possível verificar que a única amostra que se encontrava pura foi o carolo do milho, as restantes ainda continham resíduos de hemicelulose na sua constituição. A análise por TGA não demonstrou diferenças significativas entre as celuloses. Deste modo a celulose que ofereceu melhores características para posterior utilização em *scaffolds* foi a celulose de carolo de milho.

Foram produzidos, com sucesso, *scaffolds* de acordo com os parâmetros previamente delineados. Através da análise cuidada da morfologia dos *scaffolds*, foi possível concluir que todos eles apresentaram tamanhos de poro e de filamento muito similares e de acordo com o parametrizado (300  $\mu\text{m}$  e 300  $\mu\text{m}$ , respetivamente). As porosidades rondaram os 50%, no entanto a mais elevada correspondeu ao produzido com celulose de carolo de milho a 2%, revelando-se a mais vantajosa, pois uma maior e melhor proliferação celular é assegurada com maiores porosidades e interconectividades.

A análise por TGA/DSC revelou que a celulose não se encontra dispersa de forma homogénea ao longo de todo o *scaffold*, pois a mesma não foi detetada no termograma. Uma das razões para a não deteção da mesma, poderá ser o elevado binómio temperatura/tempo (10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), um aquecimento demasiado rápido leva à não deteção de substâncias presentes em baixas quantidades, pelo que futuramente, deverá ser preconizado novo ensaio com rácios mais baixos, por exemplo 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Como forma de avaliar a resistência à compressão, uma vez que o objetivo é a sua aplicação no joelho, foram realizados ensaios à compressão, não sendo encontradas diferenças significativas entre os *scaffolds* produzidos com celulose microcristalina e celulose de carolo de milho. Conclui-se, desta forma, que a celulose proveniente dos agroresíduos poderá ser um bom substituto da celulose proveniente da madeira, uma vez que apresenta resistências muito semelhantes. Por forma a verificar o comportamento dos *scaffolds* em condições similares às presentes no joelho aquando da existência de um trauma, uma vez que a concentração da lisozima aumenta como resposta a uma inflamação, foi avaliada a degradação enzimática do *scaffold* recorrendo a esta enzima. Seria desejável que não se verificassem elevados níveis de degradação após o período de teste (28 dias) uma vez que a PCL apresenta uma taxa de degradação lenta e a cartilagem apresenta uma taxa de regeneração muito baixa. Desta forma, o *scaffold* mais vantajoso, neste caso, seria aquele onde não se verificassem alterações em termos de peso, ou, caso houvesse, que este estabilizasse. O único *scaffold* que estabilizou o seu peso após a primeira semana de ensaio foi o produzido com celulose de carolo de milho a 1%. Já o seu comportamento mecânico face à compressão, foi semelhante em todos eles. No entanto, ao fim do primeiro mês nos *scaffolds* com 2% de celulose de carolo de milho já se verificou um ligeiro decréscimo das suas propriedades mecânicas, reflexo da ocorrência de alguma degradação. Contudo, este decréscimo não representa um impacto negativo, pois os valores ainda conseguem fazer face aos requisitos mínimos impostos quando aplicadas as cargas de compressão.

Em suma, a celulose de carolo de milho é uma alternativa viável à celulose microcristalina. Contudo, para se perceber qual a concentração ótima de celulose nos *scaffolds*, serão necessários realizar mais testes, inclusive perceber qual a taxa real de regeneração da cartilagem. O próximo passo deve passar pela avaliação do comportamento celular, recorrendo a testes de citotoxicidade e de proliferação celular com condrócitos.

## Capítulo 5 Bibliografia

---

- Ahmadi, Fatemeh, Rashin Giti, Solimnsn Mohammadi-Samani, e Farhad Mohammadi. 2017. «Biodegradable Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering». *Galen Medical Journal* 6(2): 70–80.
- Alemán-Domínguez, M. E. et al. 2018. «Polycaprolactone–carboxymethyl cellulose composites for manufacturing porous scaffolds by material extrusion». *Bio-Design and Manufacturing* 1(4): 245–53.
- Alemán-Domínguez, Maria Elena et al. 2019. «Three-dimensional printed polycaprolactone-microcrystalline cellulose scaffolds». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 107(3): 521–28.
- Aletaha, Daniel, e Josef S. Smolen. 2018. «Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis». *JAMA* 320(13): 1360.
- Amendola, Danila et al. 2012. «Autohydrolysis and organosolv process for recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks». *Bioresource Technology* 107: 267–74.
- Armiento, A. R., Mauro Alini, e Martin J. Stoddart. 2018. «Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair?». *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Armiento, A.R., M.J. Stoddart, M. Alini, e D. Eglin. 2018. «Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology». *Acta Biomaterialia* 65: 1–20.
- Azubuike, Chukwuemeka P, e Augustine O Okhamafe. 2012. «Physicochemical, spectroscopic and thermal properties of microcrystalline cellulose derived from corn cobs». *International Journal Of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 1(1): 9.
- Bai, Shan, e Zhenzhong Ouyang. 2017. «Study on Direct Grafting Maleic Anhydride onto Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Chains». *Journal of Macromolecular Science, Part B* 56(11–12): 853–62.
- Barros, Lillian, Ana Maria Carvalho, Jorge Sá Morais, e Isabel C. Ferreira. 2010. «Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties». *Food Chemistry* 120(1): 247–54.
- Baumann, Charles A., Betina B. Hinckel, Chantelle C. Bozynski, e Jack Farr. 2019. «Articular Cartilage: Structure and Restoration». Em *Joint Preservation of the Knee*, Cham: Springer International Publishing, 3–24.
- Bellani, Caroline F. et al. 2016. «Morphological, thermal, and mechanical properties of poly(ε-caprolactone)/poly(ε-caprolactone)-grafted-cellulose nanocrystals mats produced by electrospinning». *Journal of Applied Polymer Science* 133(21).
- Bikas, H., P. Stavropoulos, e G. Chryssolouris. 2016. «Additive manufacturing methods and modelling approaches: a critical review». *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 83(1–4): 389–405. <http://link.springer.com/10.1007/s00170-015-7576-2>.
- Brunello, G. et al. 2016. «Powder-based 3D printing for bone tissue engineering». *Biotechnology Advances* 34(5): 740–53.
- Buckwalter, Joseph A. 1998. «Articular Cartilage: Injuries and Potential for Healing». *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy* 28(4): 192–202.
- Bullough, Peter G., e Anand Jagannath. 1983. «The morphology of the calcification front in articular cartilage. Its significance in joint function». *The Journal of Bone and Joint Surgery* 65(1): 72–78.
- Carpenter, Alexis Wells, Charles-François de Lannoy, e Mark R. Wiesner. 2015. «Cellulose nanomaterials in water treatment technologies». *Environmental science & technology* 49(9): 5277–87.
- Carson, Juan R. 2018. «Articular Cartilage Repair». *Science Insights*: 1–4.
- Chemistry, Royal Society of. 2019. «Royal Society of Chemistry». <https://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0002204&MSID=C0SM00343C> (28 de Agosto de 2019).
- Chen, Wenshuai et al. 2011. «Isolation and characterization of cellulose nanofibers from four plant cellulose fibers using a chemical-ultrasonic process». *Cellulose* 18(2): 433–42.

- Chen, Yun et al. 2009. «Bionanocomposites based on pea starch and cellulose nanowhiskers hydrolyzed from pea hull fibre: Effect of hydrolysis time». *Carbohydrate Polymers* 76(4): 607–15.
- Cohen, Nathaniel P, Van C Mow, e Robert J Foster. 1998. «Composition and Dynamics of Articular Cartilage : Structure , Function , and Maintaining Healthy State». *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy* 28(4): 203–15.
- Colom, X., F. Carrillo, F. Nogués, e P. Garriga. 2003. «Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy». *Polymer Degradation and Stability* 80(3): 543–49. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139100300051X>.
- Correia, Clara R. et al. 2011. «Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering». *Tissue Engineering Part C: Methods* 17(7): 717–30.
- Courtenay, James C. et al. 2017. «Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering». *Cellulose* 24(1): 253–67.
- Deng, Lingli et al. 2018. «Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting». *Food Hydrocolloids* 74: 324–32.
- Domingos, Marco André Neves et al. 2010. «Processo e Equipamento de Fabrico Rápido por Bioextrusão». : 1–12.
- Dong, Chanjuan, e Yonggang Lv. 2016. «Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives». *Polymers* 8(2): 42.
- Fahma, Farah et al. 2011. «Effect of pre-acid-hydrolysis treatment on morphology and properties of cellulose nanowhiskers from coconut husk». *Cellulose* 18(2): 443–50.
- Fahy, Niamh, Mauro Alini, e Martin J. Stoddart. 2017. «Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: Implications for cartilage tissue engineering». *Journal of Orthopaedic Research* 36(1): 52–63.
- Farokhi, Maryam, Farinaz Jonidi Shariatzadeh, Atefeh Solouk, e Hamid Mirzadeh. 2019. «Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review». *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*: 1–18.
- Faust, Heather J., Qiongyu Guo, e Jennifer H. Elisseeff. 2019. «Cartilage Tissue Engineering». Em *Principles of Regenerative Medicine*, Academic Press, 937–52.
- Filardo, Giuseppe et al. 2013. «Scaffold-Based Repair for Cartilage Healing: A Systematic Review and Technical Note». *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 29(1): 174–86.
- Flauzino Neto, Wilson Pires, Hudson Alves Silvério, Noélio Oliveira Dantas, e Daniel Pasquini. 2013. «Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue - Soy hulls». *Industrial Crops and Products*.
- Frenkel, Sally R., e Paul E. Di Cesare. 2004. «Scaffolds for articular cartilage repair». *Annals of Biomedical Engineering* 32(1): 26–34.
- Gao, Wei et al. 2015. «The status, challenges, and future of additive manufacturing in engineering». *Computer-Aided Design* 69: 65–89. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010448515000469>.
- George, Johnsy, e S. N. Sabapathi. 2015. «Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications». *Nanotechnology, science and applications* 8: 45.
- Greenwald, Robert A., Alan S. Josephson, Herbert S. Diamond, e Ambrose Tsang. 1972. «Human cartilage lysozyme». *Journal of Clinical Investigation* 51(9): 2264–70.
- Guo, Qiang et al. 2018. «Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies». *Bone Research* 6(1): 15.
- Haaparanta, Anne-Marie et al. 2015. «Improved dimensional stability with bioactive glass fibre skeleton in poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering». *Materials Science and Engineering: C* 56: 457–66.
- Hasan, M. A., M. I. Zaki, e L. Pasupulety. 2003. «Oxide-catalyzed conversion of acetic acid into acetone: An FTIR spectroscopic investigation». *Applied Catalysis A: General*.
- Hasnaoui, Nejib, Bernard Wathélet, e Ana Jiménez-Araujo. 2014. «Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties». *Food Chemistry*.
- Hassan, Mohammad L. et al. 2012. «Nanofibers from bagasse and rice straw: process optimization and properties». *Wood Science and Technology* 46(1–3): 193–205.
- Huang, Brian J., Jerry C. Hu, e Kyriacos A. Athanasiou. 2016. «Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage». *Biomaterials* 98: 1–22.
- INE, Instituto Nacional de Estatística. 2012. «Saúde e incapacidades». [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_destaques&DESTAQUESdest\\_boui=](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=)

- 149162513&DESTAQUESmodo=2 (12 de Agosto de 2019).
- . 2018. «Superfície: total e por tipo de utilização». *Pordata*.
- . 2019. «Contas Económicas da Silvicultura».
- Jeuken, Ralph M. et al. 2016. «Polymers in cartilage defect repair of the knee: Current status and future prospects». *Polymers* 8(6): 219.
- Ji, Kang et al. 2018. «Application of 3D printing technology in bone tissue engineering». *Bio-Design and Manufacturing* 1(3): 203–10.
- Kale, Ravindra D., Prabhat Shobha Bansal, e Vikrant G. Gorade. 2018. «Extraction of microcrystalline cellulose from cotton sliver and its comparison with commercial microcrystalline cellulose». *Journal of Polymers and the Environment* 26(1): 355–64.
- Kallel, Fatma et al. 2016. «Isolation and structural characterization of cellulose nanocrystals extracted from garlic straw residues». *Industrial Crops and Products* 87: 287–96.
- Kim, Beom Su et al. 2015. «Effect of nanofiber content on bone regeneration of silk fibroin/poly( $\epsilon$ -caprolactone) nano/microfibrous composite scaffolds». *International Journal of Nanomedicine* 10: 485–502.
- Klemm, Dieter, Brigitte Heublein, Hans Peter Fink, e Andreas Bohn. 2005. «Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material». *Angewandte Chemie - International Edition* 44(22): 3358–93.
- Klippel, John H., John H. Stone, Leslie J. Crofford, e Patience H. White. 2008. *Primer on the rheumatic diseases*. Springer Science & Business Media.
- Knudson, Warren et al. 2018. «The pericellular hyaluronan of articular chondrocytes». *Matrix Biology*.
- Kon, Elizaveta et al. 2016. «Arthroscopy». Em *Arthroscopy: Basic to Advanced*, eds. Pietro Randelli et al. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 197–208.
- Księżak, Jerzy, Jolanta Bojarszczuk, e Mariola Staniak. 2018. «Evaluation of the concentration of nutrients in the seeds of Faba Bean (*Vicia faba* L. major) and PEA (*Pisum sativum* L.) depending on habitat conditions». *Polish Journal of Environmental Studies* 27(3).
- Kumar, M. N. R. 2000. «A review of chitin and chitosan applications». *Reactive and Functional Polymers* 46(1): 1–27.
- Landínez-Parra, Nancy S., Diego A. Garzón-Alvarado, e Juan Carlos Vanegas-Acosta. 2012. Injury and Skeletal Biomechanics *Mechanical Behavior of Articular Cartilage*. IntechOpen.
- Langer, Robert, e Joseph P Vacanti. 1993. «Tissue Engineering». *Science* 260(5110): 920–26.
- Lapadula, G. et al. 1998. «Chondrocyte phenotyping in human osteoarthritis». *Clinical Rheumatology* 17(2): 99–104.
- Li, Lei, Yufang Zhu, e Junhe Yang. 2018. «3D bioprinting of cellulose with controlled porous structures from NMMO». *Materials Letters* 210: 136–38.
- Li, Meng et al. 2014. «Isolation and characterization of corncob cellulose fibers using microwave-assisted chemical treatments». *International Journal of Food Engineering* 10(3): 427–36.
- Li, Yanna et al. 2016. «Facile extraction of cellulose nanocrystals from wood using ethanol and peroxide solvothermal pretreatment followed by ultrasonic nanofibrillation». *Green Chemistry* 18(4): 1010–18.
- Liu, Mei et al. 2017. «Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering». *Bone Research* 5: 17014.
- Liu, Qian et al. 2008. «Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis». *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*.
- Luo, Yongxiang et al. 2017. «3D bioprinting scaffold using alginate/polyvinyl alcohol bioinks». *Materials Letters* 189: 295–98.
- Maheswari, C. U., Reddy, K. O., Muzenda, E., Guduri, B. R., & Rajulu, A. V. 2012. «Extraction and characterization of cellulose microfibrils from agricultural residue - *Cocos nucifera* L». *Biomass and Bioenergy* 46: 555–63.
- Makris, Eleftherios A. et al. 2015. «Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage». *Nature Reviews Rheumatology* 11(1): 21.
- Malushi, Nertila, Lumturi Papa, Margarida Maia, e Hugo Oliveira. 2017. «Determination of chemical content and dry matter digestibility of some under-utilized feeds in ruminants feeding through two in vitro methods». *Scientific Papers: Series D, Animal Science - The International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science* 60: 91–96.
- Manapat, Jill Z., Qiyi Chen, Piaoran Ye, e Rigoberto C. Advincula. 2017. «3D Printing of Polymer Nanocomposites via Stereolithography». *Macromolecular Materials and Engineering* 302(9): 1600553.
- Mendes, Carlos Augusto de Carvalho Ferreira, Naiara Marinho Sgambato Furtado, Cristina Russi

- Guimarães, e Ana Maria Furtado de Sousa. 2015. «Isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from corn husk». *Materials Letters* 148: 26–29.
- Mendes, Carlos Augusto de Carvalho et al. 2015. «Chemical, physical, mechanical, thermal and morphological characterization of corn husk residue». *Cellulose Chemistry and Technology* 49(9–10): 727–35.
- Meyer, Ulrich, e Hans Peter Wiesmann. 2006a. *Bone and Cartilage Engineering: From Cells to Skeletal Defect Regeneration*.
- . 2006b. «Scaffold Structure and Fabrication». Em *Bone and Cartilage Engineering*, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 163–77.
- Morán, Juan I., Vera A. Alvarez, Viviana P. Cyras, e Analia Vázquez. 2008. «Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers». *Cellulose* 15(1): 149–59.
- Morouço, Pedro et al. 2016. «Fabrication of poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds reinforced with cellulose nanofibers, with and without the addition of hydroxyapatite nanoparticles». *BioMed Research International* 2016.
- Mota, Carlos, Dario Puppi, Federica Chiellini, e Emo Chiellini. 2015. «Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs». *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9(3): 174–90.
- Moura, Carla. 2010. «Expert system for medical applications». (Dissertação de Mestrado em Conceção e Desenvolvimento de Produto) Instituto Politécnico de Leiria.
- . 2016. «Design and fabrication of zonal cartilage constructs». tese de Doutoramento em Bioengenharia, Instituto Superior Técnico Universidade de Lisboa (IST-UL), Portugal.
- Moura, Carla Sofia, Frederico Castelo Ferreira, e Paulo Jorge Bártolo. 2016. «Comparison of three-dimensional extruded poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and polylactic acid scaffolds with pore size variation». *Procedia CIRP* 49: 209–12.
- Muir, Helen. 1995. «The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules». *BioEssays* 17(12): 1039–48.
- Murphy, Caroline A., e Maurice N. Collins. 2018. «Microcrystalline cellulose reinforced polylactic acid biocomposite filaments for 3D printing». *Polymer Composites* 39(4): 1311–20.
- Nada, A. M.A., e Mohammad L. Hassan. 2000. «Thermal behavior of cellulose and some cellulose derivatives». *Polymer Degradation and Stability*.
- Naseri, Narges et al. 2016. «3-Dimensional porous nanocomposite scaffolds based on cellulose nanofibers for cartilage tissue engineering: tailoring of porosity and mechanical performance». *RSC Advances* 6(8): 5999–6007.
- Nechyporchuk, Oleksandr, Mohamed Naceur Belgacem, e Julien Bras. 2016. «Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances». *Industrial Crops and Products*.
- Neto, Wilson Pires Flauzino, Hudson Alves Silvério, Noélio Oliveira Dantas, e Daniel Pasquini. 2013. «Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue - Soy hulls». *Industrial Crops and Products*.
- Nordli, Henriette Rogstad, Gary Chinga-Carrasco, Anne Mari Rokstad, e Brita Pukstad. 2016. «Producing ultrapure wood cellulose nanofibrils and evaluating the cytotoxicity using human skin cells». *Carbohydrate Polymers* 150: 65–73.
- Nyberg, Ethan, Alexandra Rindone, Amir Dorafshar, e Warren L. Grayson. 2017. «Comparison of 3D-printed poly- $\epsilon$ -caprolactone scaffolds functionalized with tricalcium phosphate, hydroxyapatite, bio-oss, or decellularized bone matrix». *Tissue Engineering Part A* 23(11–12): 503–14.
- O'Brien, Fergal J. 2011. «Biomaterials & scaffolds for tissue engineering». *Materials Today* 14(3): 88–95.
- Oh, Se Heang, Il Kyu Park, Jin Man Kim, e Jin Ho Lee. 2007. «In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method». *Biomaterials* 28(9): 1664–71.
- Olmedilla, Marcos Pérez. 2015. «Tissue engineering techniques to regenerate articular cartilage using polymeric scaffolds». (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Özcan, Mehmet Musa, e Haydar Haciseferoğulları. 2007. «The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents». *Journal of Food Engineering* 78(3): 1022–28.
- Park, Yong-Beom, Chul-Won Ha, Ji Heon Rhim, e Han-Jun Lee. 2018. «Stem Cell Therapy for Articular Cartilage Repair: Review of the Entity of Cell Populations Used and the Result of the Clinical Application of Each Entity». *The American Journal of Sports Medicine* 46(10): 2540–52. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0363546517729152>.
- Pereira, P. et al. 2016. «Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid». *International*

- Journal of Biological Macromolecules* 88: 373–79.
- Peterson, Lars, e Brian J Cole. 2007. *Cartilage repair strategies*. ed. Riley J Williams Iii. Totowa: Humana Press.
- Peterson, Lars, Haris S. Vasiliadis, Mats Brittberg, e Anders Lindahl. 2010. «Autologous Chondrocyte Implantation: a long-term follow-up». *The American Journal of Sports Medicine* 38(6): 1117–24.
- Pircher, Nicole et al. 2015. «Preparation and reinforcement of dual-porous biocompatible cellulose scaffolds for tissue engineering». *Macromolecular Materials and Engineering* 300(9): 911–24.
- Pointner, M. et al. 2014. «Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels». *Agronomy Research* 12(2): 391–96.
- Rashad, Ahmad, Kamal Mustafa, Ellinor Bævre Heggset, e Kristin Syverud. 2017. «Cytocompatibility of wood-derived cellulose nanofibril hydrogels with different surface chemistry». *Biomacromolecules* 18(4): 1238–48.
- Rawal, B. R., Rahul Ribeiro, Manoj Chouksey, e K. Tripathi. 2013. «Biomaterials for cartilage repair: A review». *Journal of Medical Sciences (Faisalabad)* 13(8): 615–20.
- Redler, I., V. Mow, M. Zimny, e J. Mansell. 1975. «The Ultrastructure and Biomechanical Significance of the Tidemark of Articular Cartilage.» *Clinical Orthopaedics and Related Research*.
- Richter, Christoph, Stefan Schmülling, Andrea Ehrmann, e Karin Finsterbusch. 2016. «FDM printing of 3D forms with embedded fibrous materials». Em *Design, Manufacturing and Mechatronics: Proceedings of the 2015 International Conference on Design, Manufacturing and Mechatronics (ICDMM2015)*, , 961–69.
- Rosenzweig, Derek et al. 2015. «3D-printed ABS and PLA scaffolds for cartilage and nucleus pulposus tissue regeneration». *International Journal of Molecular Sciences* 16(7): 15118–35.
- Safari, Fatemeh et al. 2019. «Human umbilical cord-derived scaffolds for cartilage tissue engineering». *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.
- Santoro, Marco, Sarita R. Shah, Jennifer L. Walker, e Antonios G. Mikos. 2016. «Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering». *Advanced drug delivery reviews* 107: 206–12.
- Santos, Ana Rita C., Henrique A. Almeida, e Paulo J. Bárto. 2013. «Additive manufacturing techniques for scaffold-based cartilage tissue engineering: a review on various additive manufacturing technologies in generating scaffolds for cartilage tissue engineering». *Virtual and Physical Prototyping* 8(3): 175–86.
- Schumacher, B L et al. 1994. «A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 311(1): 144–52.
- Sheng, Libin, Rongjia Jiang, Yu Zhu, e Yali Ji. 2014. «Electrospun cellulose nanocrystals/polycaprolactone nanocomposite fiber mats». *Journal of Macromolecular Science, Part B* 53(5): 820–28.
- Shepherd, D. 1999. «The “instantaneous” compressive modulus of human articular cartilage in joints of the lower limb». *Rheumatology (Oxford, England)* 38(2): 124–32.
- Silvério, Hudson Alves, Wilson Pires Flauzino Neto, Noélio Oliveira Dantas, e Daniel Pasquini. 2013. «Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites». *Industrial Crops and Products* 44: 427–36.
- Simon, Timothy M., e Douglas W. Jackson. 2018. «Articular cartilage: injury pathways and treatment options». *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 26(1): 31–39.
- Sivashankari, P. R., e M. Prabakaran. 2016. «Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering». *International Journal of Biological Macromolecules* 93: 1382–89.
- Slivka, Michael A., Neil C. Leatherbury, Kris Kieswetter, e Gabriele G. Niederauer. 2001. «Porous, resorbable, fiber-reinforced scaffolds tailored for articular cartilage repair». *Tissue Engineering* 7(6): 767–80.
- Soundarya, S. Preethi, A. Haritha Menon, S. Viji Chandran, e N. Selvamurugan. 2018. «Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques». *International Journal of Biological Macromolecules* 119: 1228–39.
- Sousa, Eldina Castro et al. 2014. «Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil». *Food Science and Technology (Campinas)*.
- Spigno, Giorgia, Tiziana Pizzorno, e Dante Marco De Faveri. 2008. «Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks». *Bioresource Technology*.

- Stratton, Scott et al. 2016. «Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering». *Bioactive Materials* 1(2): 93–108.
- Temenoff, Johnna S., e Antonios G. Mikos. 2000. «Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage». *Biomaterials* 21(5): 431–40.
- Trache, Djalal et al. 2016. «Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review». *International Journal of Biological Macromolecules* 93: 789–804.
- Ullah, Naseem et al. 2012. «Proximate composition, minerals content, antibacterial and antifungal activity evaluation of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels powder». *Middle-East Journal of Scientific Research* 11(3): 396–401.
- Vidal-Valverde, Concepción et al. 1998. «Nutrients and antinutritional factors in faba beans as affected by processing». *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 207(2): 140–45.
- Vinatier, C., e J. Guicheux. 2016. «Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments». *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 59(3): 139–44.
- Volesky, Monika, Timothy Charlton, e Jonathan T. Deland. 2007. «Articular Cartilage Repair Strategies in the Ankle Joint». Em *Cartilage Repair Strategies*, Humana Press, 283–309.
- Wan, Ying, Hua Wu, Xiaoying Cao, e Siqin Dalai. 2008. «Compressive mechanical properties and biodegradability of porous poly(caprolactone)/chitosan scaffolds». *Polymer Degradation and Stability* 93(10): 1736–41.
- Xia, Yang, Eric M. Darling, e Walter Herzog. 2018. «Functional properties of chondrocytes and articular cartilage using optical imaging to scanning probe microscopy». *Journal of Orthopaedic Research* 36(2): 620–31.
- Yeasmin, Mst Sarmina, e Md Ibrahim H. Mondal. 2015. «Synthesis of highly substituted carboxymethyl cellulose depending on cellulose particle size». *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Yu, Yongqi et al. 2018. «Homogeneous grafting of cellulose with polycaprolactone using quaternary ammonium salt systems and its application for ultraviolet-shielding composite films». *RSC Advances* 8(20): 10865–72.
- Zhang, Jing, e Yeon-Gil Jung. 2018. *Additive Manufacturing: Materials, Processes, Quantifications and Applications*. Butterworth-Heinemann.
- Zhang, Yi, William Jarosinski, Yeon-Gil Jung, e Jing Zhang. 2018. «Additive manufacturing processes and equipment». Em *Additive Manufacturing*, , 39–51.
- Zuluaga, Robin et al. 2009. «Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features». *Carbohydrate Polymers* 76(1): 51–59.