



Joana Marta Candelária Vasconcelos

Licenciatura em Engenharia Biomédica

**Produção de matrizes porosas 3D baseadas
em réplicas invertidas de cristais coloidais**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professor Doutor João Paulo Borges, DCM-FCT/UNL
Co - Orientador: Professor Doutor Jorge Carvalho Silva, DF-FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário António Basto Forjaz Secca
Arguente: Professora Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar Oliveira Ricardo
Vogais: Professor Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva
Professor Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges

Produção de matrizes porosas 3D baseadas em réplicas invertidas de cristais coloidais

Copyright © - Todos os direitos reservados. Joana Marta Candelária Vasconcelos; Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

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

“Ninguém é melhor que ninguém!”

Marta Vasconcelos

Agradecimentos

A essência de todas as coisas bem-sucedidas na vida reside no trabalho individual e na retenção da sabedoria alheia. Assim, aos meus orientadores, Professor João Paulo e Professor Jorge Silva, tenho a agradecer a alteração no meu percurso de vida; graças a todo o conhecimento transmitido, palavras de apoio e principalmente a vontade de querer mais, vi nascer em mim a paixão pela investigação. Aos dois, o meu autêntico MUITO OBRIGADA!

À Paulicas que revelou-se uma amiga, um apoio incondicional, uma fonte de conhecimento, um pilar que impediu que eu colapsasse. Muito obrigada por tudo!

Não posso deixar de agradecer ao Carlos João por todo o tempo dedicado ao nosso trabalho e vontade de querer sempre mais e mais. Muito obrigada pelo apoio!

Ao João Canejo e Susete Fernandes, duas pessoas fenomenais que me ensinaram e ajudaram em tudo o que puderam.

À Ana Margarida, à Esther, à Daniela, à Augusta, à Ana Catarina, à Ana Baptista, à Rafaela e a todas as pessoas do Laboratório de Polímeros.

À Dica, a minha melhor amiga de sempre e para sempre; uma irmã, uma mãe, uma família que eu tanto precisei nos dias que me afundei.

Aos meus amigos Catxinha, Chico, Teresinha, Ricardo, Margarida, Cátia, Rodolfo, Fih, Ana e Mafalda obrigada por tudo.

À Maria por ter sido uma ouvinte, amiga e companheira nos momentos bons e menos bons, muito obrigada!

Ao Gon por todos os momentos de carinho, paciência e dedicação.

À minha Kutchy e ao meu Pedro que são a minha família adotiva desde sempre.

À minha grande e fantástica família principalmente aos meus avós, Dores, Alberto, Alzira e Agostinho, porque metade do sucesso é trabalho e a outra metade é uma velinha acesa.

Aos meus irmãos, Tiago e Filipe, que são o meu maior orgulho. Muito obrigada pela proteção e amor!

À minha Mãe e ao meu Pai, honestamente os melhores pais do mundo. Devo-vos tudo e mais alguma coisa, mas acima de tudo, devo um MUITO OBRIGADA pela Joana Vasconcelos que me tornei.

Resumo

A Engenharia de Tecidos surge da necessidade recorrente de regenerar ou recriar órgãos e tecidos danificados devido a vários tipos de trauma. A carência de funcionalidades resultante pode ser resolvida através da implantação de substitutos bio-sintéticos.

O presente trabalho consiste na produção de matrizes porosas 3D baseadas em réplicas invertidas de cristais coloidais com futura aplicação em substituintes ósseos sintéticos para fraturas de não-união.

O substituinte ósseo consiste numa estrutura denominada *Inverse colloidal crystal* (ICC), em que a sua organização singular resulta numa homogénea proliferação celular e num aumento das propriedades mecânicas, quando comparada com outros substituintes.

O primeiro passo para a obtenção desta estrutura é a produção de microesferas de poliestireno, por uma técnica baseada em microfluídica. Posteriormente as microesferas são empacotadas resultando numa estrutura coesa com ligações entre microesferas vizinhas. O preenchimento dos espaços vazios entre microesferas pelo biomaterial pretendido e posterior remoção das microesferas dá origem à estrutura porosa do ICC.

ICCs poliméricos ($\phi_{Cs} = 1,00$) e compósitos ($\phi_{Cs} = 0,86$ e $\phi_{HA} = 0,14$; $\phi_{Cs} = 0,67$ e $\phi_{HA} = 0,33$; $\phi_{Cs} = \phi_{HA} = 0,50$) são produzidos e as suas propriedades mecânicas são testadas através de ensaios de compressão e comparadas com outros substituintes sintéticos. Para avaliação do comportamento dos materiais em contacto com meio biológico, foram realizados testes de citotoxicidade que revelaram uma viabilidade celular acima dos 80% em todos os ICCs.

Termos-chave: *Inverse colloidal crystals*, Microfluídica, Substituto Ósseo, Poliestireno, Estrutura Hexagonal Compacta.

Abstract

Tissue Engineering arises from the recurring need to regenerate or recreate organs and tissues damaged due to various kinds of trauma. The resultant lack of functionalities can be resolved by the implantation of engineered biological substitutes.

This work consists in the production of 3D porous scaffolds based on inverted replicas of colloidal crystals with future application on synthetic bone substituents for non-union fractures.

The bone substituent consists in a structure called Inverse colloidal crystal (ICC), where its organization results in a homogeneous cell proliferation and in an increase of the mechanical properties, when compared with other substituents.

The first step to achieve this structure is the production of polystyrene microspheres by a technique based on microfluidics. Later, the microspheres are packed resulting in a cohesive structure with connections between consecutive microspheres. Infiltration of the voids between microspheres by the biomaterial of interest and subsequent dissolution of the microsphere leads to the porous structure of the ICC.

Polymeric ICCs ($\phi_{CS} = 1,00$) and composites ($\phi_{CS} = 0,86$ and $\phi_{HA} = 0,14$; $\phi_{CS} = 0,67$ and $\phi_{HA} = 0,33$; $\phi_{CS} = \phi_{HA} = 0,50$) are produced and their mechanical properties are tested through compression tests and compared with others synthetics substitutes. To evaluate the behavior of the materials in contact with biological environment, cytotoxicity tests were performed. These revealed cell viability above 80% in all the ICCs.

Keywords: Inverse colloidal crystals, Microfluidics, Bone Substitute, Polystyrene, Hexagonal Compact Structure.

Índice

Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
Nomenclatura	xvii
Motivação e Estrutura da Dissertação	1
I. Introdução	3
I.1. Osso Humano	3
Fase Orgânica	5
Fase Mineral	5
I.2. Engenharia de Tecidos	6
Biomateriais.....	6
<i>Scaffolds</i>	7
Réplicas Invertidas de Cristais Coloidais	9
ICCs para Regeneração Óssea.....	12
II. Procedimento Experimental.....	15
II.1. Técnicas de Produção	15
Microfluídica	15
Produção dos Cristais Coloidais	20
Produção de Nanocristais de Hidroxiapatite	22
Impregnação do CC.....	23
Obtenção do ICC	25
II.2. Técnicas de Caracterização.....	25
Calorimetria Diferencial de Varrimento/Termogravimetria (DSC/TG/DTA).....	25
Microscopia eletrônica de varrimento/Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (SEM/EDS).....	25
Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	26
Difração de Raios-X (DRX).....	26
Propriedades Mecânicas - Ensaio de Compressão	27
Testes de Citotoxicidade.....	27
III. Análise de Resultados.....	31
III.1. Microfluídica.....	31

Policaprolactona (PCL).....	31
Poliestireno (PS)	36
III.2. Produção dos CCs	41
III.3. Caracterização dos Nanocristais de Hidroxiapatite.....	43
III.4. Obtenção dos ICCs.....	45
III.5. Citotoxicidade	48
III.6. Propriedades Mecânicas.....	49
IV. Conclusões e Perspetivas Futuras	57
Bibliografia	59
Anexos	67
Anexo A	69
Anexo B	73
Anexo C	83

Índice de Figuras

Figura 1 - Variação do módulo de Young em função da densidade de diversos materiais incluindo o osso esponjoso e o cortical (adaptado de [9]).....	3
Figura 2 - Estrutura do Osso Humano [10].	4
Figura 3 - Orientação de fibrilas de colagénio [17].....	5
Figura 4 - Fibrilas de colagénio reforçadas por hidroxiapatite [13].	6
Figura 5 – Representação esquemática de um ICC.	9
Figura 6 - Fases da produção de ICCs: 1. Produção de microesferas uniformes; 2. Empacotamento e revestimento das microesferas; 3. Obtenção do ICC (adaptado de [36]).....	10
Figura 7 - Estrutura do quitosano.	13
Figura 8 - Esquema de montagem da técnica baseada em microfluídica: A corresponde à fase contínua, B à fase descontínua e C ao ponto de junção das duas fases.	16
Figura 9 - Sistema de agitação de peneiros.	20
Figura 10 – Representação esquemática do molde de 32 poços para formação dos CCs. Cada poço possui um diâmetro de 5,93 mm e a altura do poço cerca de 4,00 mm.	21
Figura 11 - Esquema das soluções usadas para impregnação do CC. É de notar que a representação dos bastonetes de hidroxiapatite é meramente ilustrativo pois estes têm uma dimensão na ordem dos nanómetros não sendo possível a sua observação a olho nu.....	23
Figura 12 - Placa de 48 poços para testes de citotoxicidade dos ICCs. (Legenda azul – poços com meio de cultura em contacto com os ICCs; legenda vermelha – poços com células Saos-2 e meio; legenda verde – poços de controlo das células, C, e C ₊ , e do meio de cultura C _M).....	28
Figura 13 - Gráfico do estudo da variação das condições de produção de microesferas de PCL (FC- fase contínua; FD – fase descontínua).	34
Figura 14 - Observação em SEM de microesferas de PCL: a) Ampliação de 150x para observação da uniformidade dos tamanhos; b) Ampliação de 250x para observação da superfície das microesferas.....	35
Figura 15 - Termograma de DSC do PCL.....	36
Figura 16 - Relação entre número de Capilar e número de Webber para transições de regime de jato para gota-a-gota. (adaptado de [97]). O círculo a azul representa uma aproximação ao intervalo de resultados das microesferas de PCL e de PS.	37
Figura 17 - Gráfico do estudo da variação das condições de produção de microesferas de PS (FC- fase contínua; FD – fase descontínua).....	39

Figura 18 - Observação em SEM de microesferas de PS: a) Ampliação de 150x para observação da uniformidade dos tamanhos; b) Ampliação de 314x para observação da superfície das microesferas.	40
Figura 19 - Termograma de DSC do PS. O gráfico inferior consiste numa ampliação da zona do termograma (gráfico superior) assinalada com o círculo a azul.	41
Figura 20 - Empacotamento hexagonal compacto das esferas de PS para uma temperatura de <i>annealing</i> de 125°C.	42
Figura 21 - Empacotamento hexagonal compacto das esferas de PS para uma temperatura de <i>annealing</i> de 135°C.	42
Figura 22 - Bastonetes de hidroxiapatite observados em SEM: a) Ampliação de 10000X; b) Ampliação de 40000X. O comprimento dos bastonetes é aproximadamente 200 nm.	43
Figura 23 - Espetro de ATR-FTIR de hidroxiapatite comercial e dos bastonetes de HA.	44
Figura 24 - Difractogramas da hidroxiapatite de partida (comercial) e dos bastonetes produzidos.	44
Figura 25 – Espetro de EDS das paredes dos ICCs: a) $\Phi_{Cs} = 1,00$ e $\Phi_{HA} = 0,00$; b) $\Phi_{Cs} = 0,86$ e $\Phi_{HA} = 0,14$; c) $\Phi_{Cs} = 0,67$ e $\Phi_{HA} = 0,33$; d) $\Phi_{Cs} = \Phi_{HA} = 0,50$	46
Figura 26 - Imagens SEM dos ICCs com 200x de ampliação: a) $\Phi_{Cs} = 1,00$ e $\Phi_{HA} = 0,00$; b) $\Phi_{Cs} = 0,86$ e $\Phi_{HA} = 0,14$; c) $\Phi_{Cs} = 0,67$ e $\Phi_{HA} = 0,33$; d) $\Phi_{Cs} = \Phi_{HA} = 0,50$	47
Figura 27 - Resultados obtidos nos testes de citotoxicidade utilizando como indicador o reagente PrestoBlue™. Os poços que apresentam uma cor lilás indicam presença de atividade metabólica e consequentemente a presença de células viáveis.	48
Figura 28 - Curva de compressão típica de um ICC com frações volúmicas $\Phi_{Cs} = 0,86$ e $\Phi_{HA} = 0,14$. Os liofilizados apresentam curvas de compressão qualitativamente semelhantes.	50
Figura 29 - Variação dos parâmetros mecânicos dos ICC, com a fração volúmica de HA. O gráfico superior apresenta o módulo de Young teórico (teo) a azul e o experimental (exp) a vermelho dos ICCs para diferentes frações volúmicas de hidroxiapatite. O gráfico inferior apresenta a tensão de colapso teórica (azul) e experimental (vermelho) em função de Φ_{HA}	51
Figura 30 - Variação dos parâmetros mecânicos dos liofilizados, com a fração volúmica de HA. O gráfico superior apresenta o módulo de Young experimental (exp) dos liofilizados para diferentes frações volúmicas de hidroxiapatite. O gráfico inferior apresenta a tensão de colapso experimental dos liofilizados em função de Φ_{HA}	52
Figura 31 - Empacotamento hexagonal compacto das esferas de PS para uma temperatura de <i>annealing</i> de 115°C.	54
Figura 32 – Imagens de SEM de um ICC 100% polimérico correspondendo a uma temperatura de <i>annealing</i> de 115°: a) Ampliação 100x; b) Ampliação 200x.	54

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Técnicas de produção de <i>scaffolds</i> (adaptado de [25]).....	8
Tabela 2 - Caraterísticas gerais do poli(álcool vinílico) (PVA).	17
Tabela 3 – Caraterísticas gerais do policaprolactona (PCL).	18
Tabela 4 – Caraterísticas gerais do poliestireno (PS).	19
Tabela 5 – Cálculo da fração volúmica de acordo com a Lei das Misturas para cada amostra. Amostra A: $\Phi_{Cs} = 1,00$ e $\Phi_{HA} = 0,00$; Amostra B: $\Phi_{Cs} = 0,86$ e $\Phi_{HA} = 0,14$; Amostra C: $\Phi_{Cs} = 0,67$ e $\Phi_{HA} = 0,33$; Amostra D: $\Phi_{Cs} = \Phi_{HA} = 0,50$	24
Tabela 6 - Número de Capilar para uma fase contínua de PVA a 2% m/m e a diferentes caudais.32	
Tabela 7 - Número de Webber para uma fase descontínua de PCL a 2%, 5% e 7% m/m.	32
Tabela 8 - Estudo da variação das condições de produção de microesferas de PCL (FC- fase contínua; FD – fase descontínua; DP – desvio padrão). A ampliação aplicada é de 10x.	33
Tabela 9 - Número de Capilar para uma fase contínua de PVA a 5% m/m e a diferentes caudais.36	
Tabela 10 - Número de Webber para uma fase descontínua de PS a 5% m/m.	37
Tabela 11 - Estudo da variação das condições de produção de microesferas de PS (FC- fase contínua; FD – fase descontínua; DP – desvio padrão). A ampliação utilizada foi de 10x.	38
Tabela 12 - Porosidades associadas a cada ICC.	47
Tabela 13- Resultados das medições de fluorescência no teste de citotoxicidade, utilizando como indicador o reagente PrestoBlue™. A viabilidade celular para todas as amostras é superior a 80%. A, B e C correspondem aos três ICCs produzidos para cada fração volúmica, <i>xamostra</i> corresponde à média das amostras A,B e C e $\sigma_{amostra}$ ao respetivo desvio padrão.	49
Tabela 14 - Resultados dos testes de compressão aos ICCs e às suas paredes.	85

Nomenclatura

ATR	<i>Attenuated total reflectance</i>
Ca:P	Razão Cálcio/Fósforo
CC	<i>Colloidal Crystals</i>
C _M	Controlo do Meio
C ₊	Controlo Positivo
C ₋	Controlo Negativo
Cs	Quitossano
ρ	Densidade
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
DRX	Difracção de Raios-X
EDS	<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
ϕ	Fração volúmica
HA	Hidroxiapatite
ICC	<i>Inverse Colloidal Crystal</i>
M	Massa molar
N	Newton
mm	Milímetros
μm	Micrómetros
nm	Nanómetros

O/W	<i>Oil-in-water</i>
PCL	Policaprolactona
PS	Poliestireno
PVA	Poli(álcool vinílico)
rpm	Rotações por minuto
Saos-2	<i>Sarcoma osteogenic</i>
SEM	<i>Scanning Electronic Microscopy</i>

Motivação e Estrutura da Dissertação

O esqueleto é o responsável por sustentar, proteger e garantir um bom fornecimento de minerais ao corpo; é este órgão que define a forma do corpo, protege órgãos vitais de possíveis lesões e serve de base de inserção muscular no auxílio à locomoção. Contudo existem determinadas lesões que reduzem ou anulam as propriedades ósseas consideradas normais. Patologias como a osteoporose ou doenças congénitas, bem como sobrecargas em determinadas regiões ósseas, devido a microtraumas repetitivos ou acidentes, levam a fraturas que por vezes se revelam um desafio para a cirurgia ortopédica [1].

No caso de fraturas de não-união recorre-se a enxertos ósseos com o objetivo de melhorar a reparação endógena dos tecidos e oferecer um maior suporte ao osso lesado. Aproximadamente 2,2 milhões de cirurgias ortopédicas realizadas anualmente em todo o mundo envolvem enxertos ósseos; este número corresponde a 10% do total de cirurgias realizadas e representa um gasto anual de 2,5 mil milhões de dólares [2, 3].

Porém a qualidade de vida dos pacientes é fortemente afetada principalmente em casos de alterações ocorridas aquando do tratamento das lesões traumáticas. Este tipo de alteração deve-se essencialmente a uma circulação inadequada de sangue na região fraturada, instabilidade no local da fratura ou falta de contacto entre fragmentos ósseos [4]. Apesar da tentativa de utilização de osso autólogo ou de cadáver neste tipo de cirurgias, devido à compatibilidade existente entre tecidos humanos, o risco de complicações é considerável (8-39%) [5]. Como consequência, a evolução natural de cicatrização dos tecidos é retardada ou interrompida provocando complicações na recuperação da fratura [6].

Uma grande vantagem apresentada pelos enxertos sintéticos, em relação aos naturais, prende-se com o facto de minimizar os custos e as complicações relacionadas com a utilização do osso humano. É expectável que a utilização de um substituinte ósseo sintético promova a proliferação de osteoblastos e que permita o desenvolvimento do osso natural em torno do enxerto.

Este trabalho pretende ser mais uma contribuição para o desenvolvimento de substitutos ósseos sintéticos. Neste caso pretende-se desenvolver novos substitutos baseados em réplicas invertidas de cristais coloidais, que associam uma elevada porosidade e interconectividade dos poros a propriedades mecânicas adequadas ao crescimento de novo tecido ósseo. Esta combinação de propriedades não é encontrada noutros substitutos, pelo que se justifica plenamente o seu desenvolvimento.

A dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos.

Num primeiro capítulo é abordada a morfologia do osso e de que maneira a engenharia de tecidos tenta recriar esta morfologia acedendo a variadas técnicas.

No capítulo II são apresentados os materiais e métodos para a produção do substituto ósseo reportado neste trabalho. A hidroxiapatite é utilizada como simulador da fase mineral e o quitosano como simulador da fase orgânica do osso natural.

Em seguida, no capítulo III são apresentados os resultados da caracterização do substituinte sintético. A variação das propriedades mecânicas bem como da viabilidade celular para substituintes ósseos constituídos só por quitosano e com frações volúmicas de $\phi_{Cs} = 0,86$ e $\phi_{HA} = 0,14$, $\phi_{Cs} = 0,67$ e $\phi_{HA} = 0,33$ e $\phi_{Cs} = \phi_{HA} = 0,50$ é apresentada.

No último capítulo (IV) apresentam-se as conclusões e as perspetivas futuras deste trabalho.

I. Introdução

I.1. Osso Humano

A compreensão do corpo humano e das suas funções como conjugação de diversos processos fisiológicos tem sido alvo de intenso estudo pela comunidade científica. A integração de um ou mais órgãos na realização de uma determinada tarefa só é possível graças ao sistema de sustentação facultado pelo nosso esqueleto.

O osso, a unidade básica do esqueleto, apresenta-se como o principal responsável pelo suporte do corpo e dos tecidos circundantes, que advém da excelente combinação entre rigidez e ductilidade [7, 8]. Tal como noutros materiais, a rigidez e a ductilidade do osso cortical e do osso esponjoso dependem da densidade do material (Figura 1).

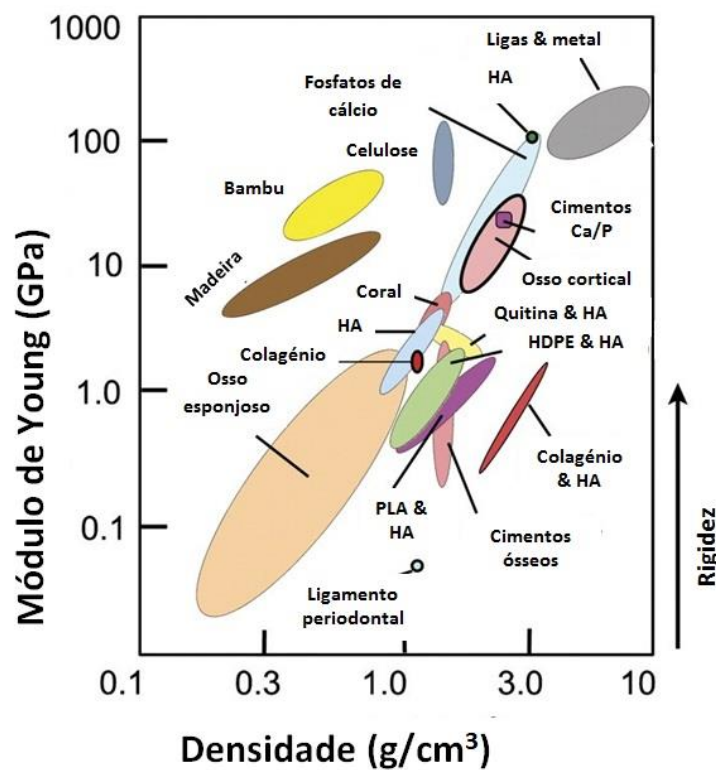


Figura 1 - Variação do módulo de Young em função da densidade de diversos materiais incluindo o osso esponjoso e o cortical (adaptado de [9]).

Além das funções de suporte, como base de inserção muscular e articulações (que relacionam ossos contíguos), o osso desempenha outras funções, tais como a proteção dos órgãos vitais, o auxílio na locomoção e absorção de impacto e ainda funções metabólicas: é na medula óssea que se formam os precursores sanguíneos das hemácias e das plaquetas. É também no osso que se

encontra o maior armazenamento de minerais do corpo humano, tais como fósforo, cálcio e magnésio [8].

As suas distintas propriedades mecânicas resultam da sua morfologia e composição. No que respeita à sua morfologia há que identificar uma estrutura hierárquica constituída por três níveis estruturais fundamentais: o macroestrutural, onde se incluem o osso compacto e esponjoso, o microestrutural que abrange o Sistema de Havers e os canais de Volkmann (Figura 2) e o nanoestrutural que inclui fibrilas de colagénio e a fase mineral. Este arranjo estrutural confere ao osso uma organização heterogénea e anisotrópica [7, 11].

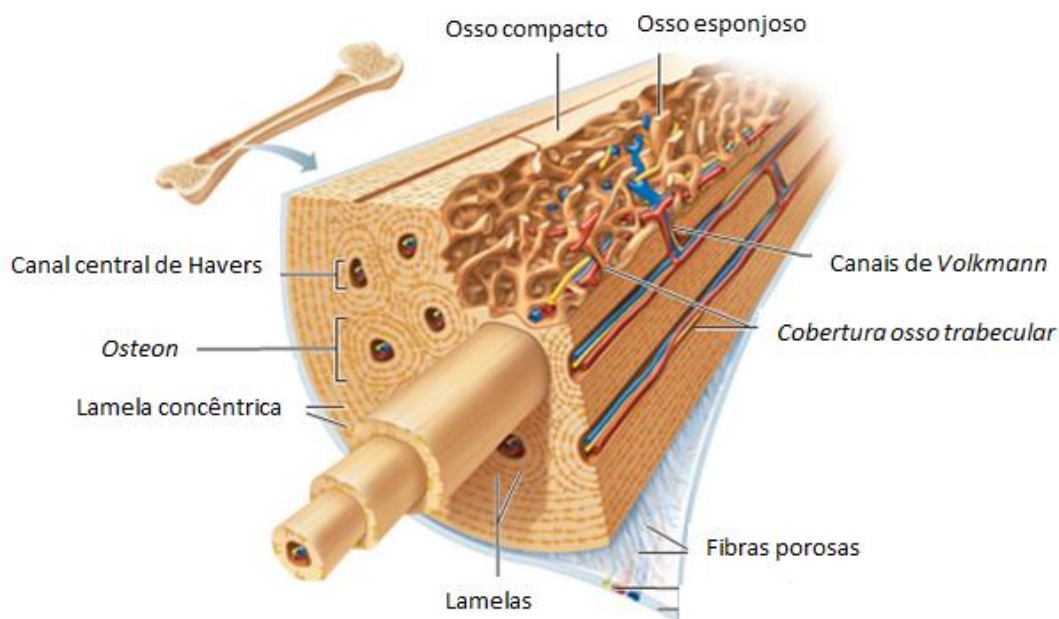


Figura 2 - Estrutura do Osso Humano [10].

No que toca à composição óssea identificam-se uma componente orgânica constituída maioritariamente por água e colagénio tipo I e uma componente mineral que consiste em 65-75% da massa do osso e incorpora principalmente cálcio e fósforo na forma de cristais de hidroxiapatite (HA) [12].

É a excelente organização dos nanocristais de hidroxiapatite na matriz de colagénio que dita as propriedades excepcionais do osso sendo que esta relação existente entre a fase mineral e a fase orgânica óssea torna difícil definir que tipo de compósito se trata. Por um lado, a grande percentagem de cerâmico que envolve as fibrilas de colagénio remete a uma matriz cerâmica

reforçada com a fase orgânica¹, e por outro lado a presença de nanocristais individuais de hidroxiapatite revela uma matriz polimérica revigorada por estes nanocristais [13].

Fase orgânica

A fase orgânica é constituída por colagénio tipo I, uma fibra proteica sintetizada sob a forma de fibrilas pelos osteoblastos na matriz extracelular [7]. Apesar da existência de 27 tipos de colagénio diferentes, o colagénio tipo I é o mais abundante no corpo humano e está distribuído por quase todos os tecidos conjuntivos, à exceção da cartilagem hialina. O colagénio tipo I organiza-se em fibrilas (Figura 3) e constitui cerca de 95% do total de colagénio presente no osso; outros tipos de colagénio (III e V) também estão presentes e pensa-se que terão a função de regular o tamanho das fibrilas [14]. Por outro lado, as fibrilas de colagénio tipo I oferecem um ambiente promotor da diferenciação dos osteoblastos *in vitro* e da osteogénese *in vivo* [15, 16]. As excelentes propriedades biomecânicas da matriz óssea resultam da presença deste polímero no nível nanoestrutural [7].

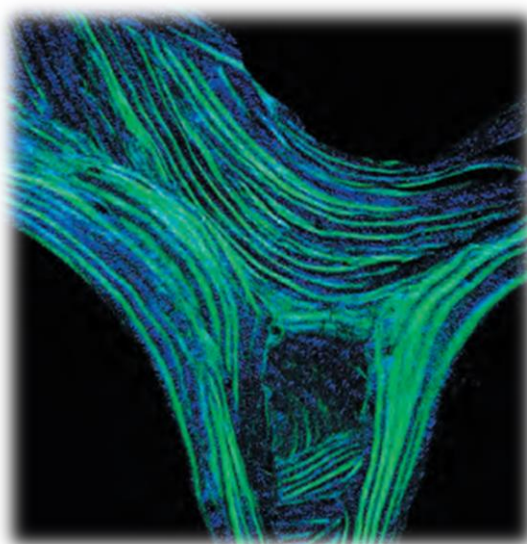


Figura 3 - Orientação de fibrilas de colagénio [17].

Fase mineral

A fase inorgânica, ou mineral, integra cristais de hidroxiapatite carbonatada cuja composição varia durante a sua mineralização e maturação [7]. A deficiência de cálcio apresentada pela hidroxiapatite no osso reflete-se numa razão estequiométrica inferior à da hidroxiapatite pura

¹ Na realidade a fase orgânica serve como ligante da fase cerâmica. O uso abusivo do termo reforço deve-se, unicamente, ao facto de a fração volúmica de material polimérico ser muito superior à do cerâmico, uma vez que apenas o cerâmico pode atuar como reforço mecânico do compósito.

(Ca:P = 1,67) [13]. A fase de maturação dos nanocristais ocorre ao longo do eixo longitudinal, num crescimento anisotrópico da hidroxiapatite paralelo às fibrilas de colagénio, resultando numa matriz coesa de polímero reforçado pelo cerâmico (Figura 4) [7]. Estes nanocristais representam uma fase não estequiométrica em que a HA apresenta-se sob a forma de bastonetes com 20 nm de diâmetro e 40-200 nm de comprimento, e com algumas impurezas incorporadas tais como carbonato, cloreto e magnésio [18, 19].

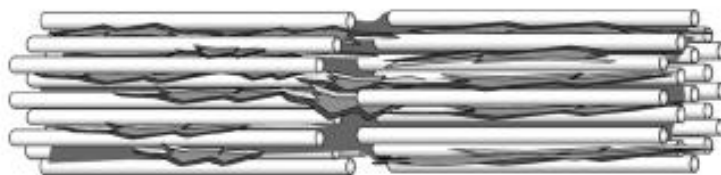


Figura 4 - Fibrilas de colagénio reforçadas por hidroxiapatite [13].

I.2. Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos é definida como uma área multidisciplinar que alia à engenharia dos materiais o conhecimento e tecnologia celular, com o intuito de desenvolver substitutos biológicos para regenerar ou recriar órgãos e tecidos [15]. Nestes substitutos biológicos são usados, regra geral, biomateriais biodegradáveis [20].

Biomateriais

A tentativa de definir biomaterial remonta a 1987 quando D.F. Williams sugeriu o que seria a definição intemporal do mesmo [21].

“Um biomaterial é um material não viável² utilizado em aparelhos médicos, destinado a interagir com os sistemas biológicos.”

A esta definição está inerente a necessidade de existir biocompatibilidade entre o biomaterial e o organismo, ou seja, garantir que o material gere uma resposta apropriada a uma aplicação específica. A resposta dada pelo organismo implica adesão, proliferação e diferenciação celular e depende essencialmente da natureza e do tipo de biomaterial [22].

Assim, os biomateriais podem ser classificados de acordo com a sua composição química como metais, cerâmicos, polímeros ou compósitos e podem ser caracterizados segundo o comportamento biológico que desencadeiam como bioinertes, bioativos, biodegradáveis ou bioreabsorvíveis [20].

² O termo ‘não viável’ refere-se a um biomaterial sem capacidade de subsistir, crescer e desenvolver-se como um sistema biológico isolado (ex.: plantas ou embriões).

Os biomateriais utilizados como substitutos biológicos podem ser divididos em duas categorias distintas de acordo com a sua origem. Podem ser denominados materiais sintéticos ou naturais, sendo que os materiais sintéticos são os mais utilizados devido ao facto de poderem ser produzidos de acordo com as propriedades desejadas. Nos materiais sintéticos, ao contrário dos materiais naturais, é possível ter total controlo sobre o trinómio estrutura/composição/propriedades [23, 24].

A tentativa de aperfeiçoamento de biomateriais enquanto substitutos biológicos, bem como da sua arquitetura e propriedades intrínsecas, deu origem a modelos sintéticos 3D denominados *scaffolds*.

Scaffolds

Um *scaffold* consiste numa estrutura tridimensional cuja arquitetura define o tamanho e formato do novo tecido que ali se irá regenerar [16, 25]. Além de uma estrutura bem definida, o *scaffold* segue determinados requisitos fundamentais [26]:

1. O material de que é constituído deve ser biocompatível, biodegradável e promotor da interação celular com o tecido [27, 28];
2. A sua morfologia e propriedades físico-químicas deverão ser semelhantes ao órgão ou tecido a substituir [16, 27, 29];
3. Deve possuir uma rede 3D de poros interconectados controlando o seu tamanho, topologia e superfície de modo a garantir a adesão, migração, proliferação celular e transporte de nutrientes e metabolitos [27, 23];
4. Que se degrade lentamente e seja reabsorvido, ao mesmo tempo que as células proliferam e promovem a formação do novo tecido [15].

Métodos de produção de *scaffolds*

Na tentativa de produzir um *scaffold* com as propriedades acima mencionadas, vários métodos e tecnologias têm sido sugeridas por diversos autores (Tabela 1).

Analisando as diferentes técnicas de produção de *scaffolds* é possível afirmar que todas elas falham num ou mais requisitos exigidos para a aplicação médica destas estruturas. Fraca adesão celular, estrutura irregular e pouca porosidade são alguns dos fatores apontados como problemas recorrentes [30, 31].

Tabela 1 - Técnicas de produção de *scaffolds* (adaptado de [25]).

Técnica	Porosidade (% V/V)	Vantagens	Desvantagens
<i>Gas Foaming</i>	<80	-	Porosidade fechada
<i>Solvent Casting</i> + <i>Particulate leaching</i>	82-92	Poros esféricos	Aplicação apenas a membranas muito finas
<i>Sintered microspheres</i>	32-39	Poros interconectados	Fraca porosidade
<i>Freeze-drying</i>	<97	-	Poros orientados que podem apresentar fraca interconectividade
<i>3D Printing</i>	<60	100% Interconectividade	Arquitetura de poros irregulares e resolução limitada
<i>Extrusion</i>	<80	100% Interconectividade	-

Como solução deste tipo de questões, vários estudos têm apontado um *scaffold* com elevado grau de organização e interconectividade denominado Réplica Invertida de Cristais Coloidais (*Inverse Colloidal Crystal* - ICC).

Réplicas Invertidas de Cristais Coloidais

Os ICCs são um tipo de *scaffold* de possível aplicação biomédica, com a grande vantagem de possuírem uma geometria distinta e de fácil produção.

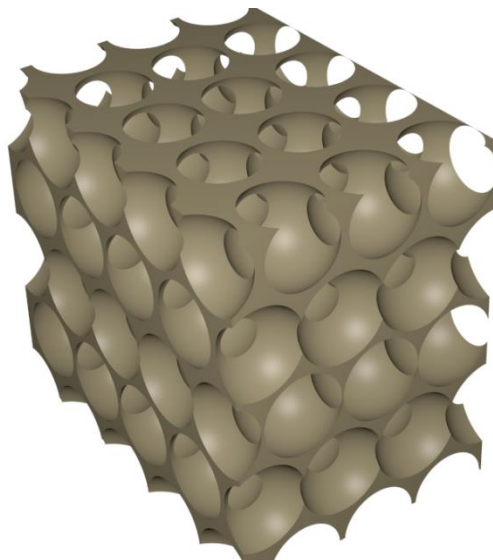


Figura 5 – Representação esquemática de um ICC.

Esta geometria (Figura 5) respeita um empacotamento hexagonal em que a conexão entre as cavidades, outrora ocupadas por nano/microesferas, é feita através de aberturas circulares garantindo uma porosidade elevada (no mínimo 74%), com propriedades mecânicas adequadas a aplicações biomédicas [32, 33]. O excelente controlo da porosidade aliado ao elevado grau de organização permite um melhor e mais homogêneo domínio das interações célula-célula e célula-*scaffold* [16, 34].

O grande benefício dos ICCs prende-se fundamentalmente com a adesão e proliferação celular que são fortemente afetadas pela morfologia do *scaffold*, em que o bom fornecimento de oxigénio e nutrientes é considerado um pré-requisito fundamental para garantir a viabilidade celular e originar um crescimento uniforme do tecido [29, 35].

Produção de um ICC

A execução de um ICC consiste em recriar um modelo 3D de cristais coloidais dispostos em estrutura hexagonal compacta. As suas paredes são revestidas de um biomaterial (polímero, cerâmico ou compósito), que solidifica na própria estrutura. Posteriormente, os cristais coloidais são removidos dando origem a uma estrutura tridimensional com poros interconectados.

Em síntese, a produção de ICCs assenta em três passos fundamentais (Figura 6):



Figura 6 - Fases da produção de ICCs: 1. Produção de microesferas uniformes; 2. Empacotamento e revestimento das microesferas; 3. Obtenção do ICC (adaptado de [36]).

1. Produção de microesferas uniformes;

A dimensão das partículas esféricas pode variar da gama dos nanómetros aos micrómetros de acordo com o método de produção e a que é que são destinadas [37]. Para a construção de ICCs, aplicados ao campo da biomedicina, devem ser utilizadas esferas que resultem em cavidades de dimensão suficiente para garantir a migração e proliferação celular. O tamanho da cavidade a produzir, ou seja, o tamanho da esfera, compreende a gama dos micrómetros e depende essencialmente do local da aplicação e do tamanho das células do tecido a regenerar.

No fabrico de ICCs para aplicações biomédicas são utilizadas microesferas poliméricas produzidas através de vários processos dos quais destacam-se a precipitação [38, 39, 40], dispersão [41, 42], emulsão [43, 44], suspensão [45, 46, 47], sol-gel [48, 49] entre outras.

Todavia estes processos apresentam limitações nomeadamente na dificuldade de execução ou na uniformidade do tamanho das microesferas. Na literatura [50, 51, 52, 53] a microfluídica é apresentada como uma técnica de fácil execução e que permite a produção de microesferas de tamanho e superfície uniformes, com desvio padrão na ordem dos 5% [54]. Nesta técnica, que será abordada em pormenor no capítulo seguinte, as esferas são obtidas a partir de emulsões óleo-em-água (O/W).

Na maioria das técnicas utilizadas para a produção de microesfera, os polímeros são o material de eleição. Estes consistem em moléculas de elevado peso molecular (macromoléculas) constituídas pelo encadeamento (por ligação covalente) de unidades que se repetem ao longo da sua estrutura [55]; quando são biocompatíveis denominam-se biopolímeros³.

³ O termo biopolímero é também usado na literatura para definir polímeros de origem natural. Contudo, o prefixo bio é, ao longo deste trabalho, usado para definir qualquer material para aplicação médica e, portanto, biocompatível.

Os biopolímeros podem ser não degradáveis, apresentando estabilidade química durante a sua aplicação no organismo (ex. polietileno), ou biodegradáveis, em que a sua degradação ocorre no decorrer da aplicação biomédica, promovendo assim a eliminação do mesmo por parte do corpo (ex. policaprolactona). Os biopolímeros que mais se destacam na produção de microesferas para aplicação em ICCs são o policaprolactona (PCL) [36], o poli-(ácido láctico) (PLLA) [16, 56], o poli-(ácido glicólico) (PLGA) [56] e o poliestireno (PS) [34].

2. Empacotamento das microesferas;

Após produção, as microesferas são empacotadas dando origem a estruturas com organização singular, designadas cristais coloidais [57]. Esta organização resulta de forças de atração-repulsão durante o empacotamento e está diretamente relacionada com o tamanho, composição e cristalinidade das microesferas [58].

Estas forças de interação entre microesferas dão origem a uma estrutura hexagonal compacta, que emerge essencialmente da capacidade das microesferas se auto-organizarem no espaço a que estão confinadas. Métodos como a sedimentação por gravidade, centrifugação ou eletroforese têm sido utilizados para promover o empacotamento desejado [59].

A passagem de um simples empacotamento de esferas para uma estrutura sólida só é possível se forem criados pontos de união entre esferas consecutivas. Frequentemente, verifica-se na literatura o uso de tratamentos térmicos que têm como objetivo “amolecer” o polímero, promovendo a difusão de material entre as esferas e a sua, conseqüente, colagem. Este tratamento térmico é designado por *annealing*⁴.

Um fator que influencia fortemente o *annealing* é o grau de cristalinidade do polímero constituinte das microesferas. Ao utilizar um polímero semicristalino, como o policaprolactona (PCL), é difícil controlar o processo de *annealing* que pode resultar tanto numa não fusão de microesferas consecutivas, como numa fusão completa do material, dando origem a um filme polimérico. O uso de polímeros amorfos, que se apresentam num estado “amolecido” acima da temperatura de transição vítrea⁵, facilita a difusão do material entre as esferas e a sua colagem.

3. Obtenção do ICC

⁴ Não confundir o termo *annealing* usado na literatura dos ICCs com o mesmo termo em Ciência de Materiais, que significa recozimento (um tratamento térmico usado em Metalurgia).

⁵ Os polímeros amorfos, tal como os vidros, apresentam uma temperatura de transição vítrea, acima da qual as moléculas adquirem mobilidade. Acima desta temperatura o material apresenta-se numa forma pastosa e é processável.

A consistência do ICC é garantida pelo polímero biocompatível de que são preenchidos os espaços entre microesferas. O preenchimento pode ser feito por polimerização [60, 61], deposição eletroquímica [62], precipitação [63], entre outros [64, 65].

Após a ocupação dos espaços intersticiais, as microesferas são removidas do *scaffold* e é obtida uma estrutura tridimensional que apresenta uma porosidade elevada, na ordem dos 74%, resultado da interconectividade gerada pelo arranjo hexagonal compacto.

ICCs para regeneração óssea

Na aplicação de ICCs como substituinte ósseo está intrínseca a necessidade de recriar um modelo ósseo 3D, que possua propriedades físicas e mecânicas adequadas à regeneração óssea [30, 66]. O ICC deve, tal como qualquer outro substituto ósseo, possuir resistência mecânica adequada, de forma a suportar o crescimento do novo tecido [16].

Por outro lado é essencial garantir um ambiente promotor do crescimento celular no osso sintético. É esperada a invasão de células osteogênicas e osteoblastos no ICC, que se degradará lentamente e será reabsorvido, ao mesmo tempo que as células proliferarão e promoverão a formação do tecido [23].

A porosidade do ICC e o biomaterial que preenche os espaços intersticiais das microesferas, são os dois fatores que mais impacto têm na tentativa de recriar as propriedades acima mencionadas.

A porosidade em substituintes sintéticos para regeneração óssea é superior a 70%, garantindo uma interconectividade completa e uma boa base de sustentação para a carga suportada pelo ICC [67].

Cuudihy e Kotov introduziram em 2008 a utilização de um polímero biodegradável, o PLGA, para a produção de ICCs com aplicação óssea [68]. Além da influência do polímero nas propriedades do ICC, verificaram que quanto maior era o tamanho das microesferas (100-300 μm), maior era a adesão celular e crescimento ósseo.

Mais tarde Nichols e a sua equipa [69] abordaram a utilização de hidrogéis de poli(acrilamida) no fabrico de ICCs e observaram a forte adesão, proliferação e diferenciação celular ao mesmo.

A necessidade de recriar a fase orgânica óssea levou Choi e os seus colegas [36] a desenvolver um ICC de quitosano de modo a que a introdução deste polímero promovesse a adesão de células ósseas.

Todavia alguns autores [67, 70] procuraram introduzir o que seria a melhor simulação das fases existentes no osso natural, adicionando hidroxiapatite (HA). A presença de HA, melhora

fortemente as propriedades mecânicas do compósito e, devido ao facto de ser um material osteoindutor (em parte devido à sua semelhança química com a componente mineral do osso humano e à sua bioatividade), permite uma melhor integração do *scaffold* no tecido.

Por outro lado, como visto anteriormente, a fase mineral óssea contém nanocristais de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) em forma de bastonete. Neste trabalho iremos usar nanocristais de HA em forma de bastonete para a produção de *scaffolds* compósitos baseados em ICCs. Para a matriz do compósito será usado o quitosano, um polímero natural biocompatível capaz de mimetizar a estrutura da fase orgânica do osso humano [71, 72].

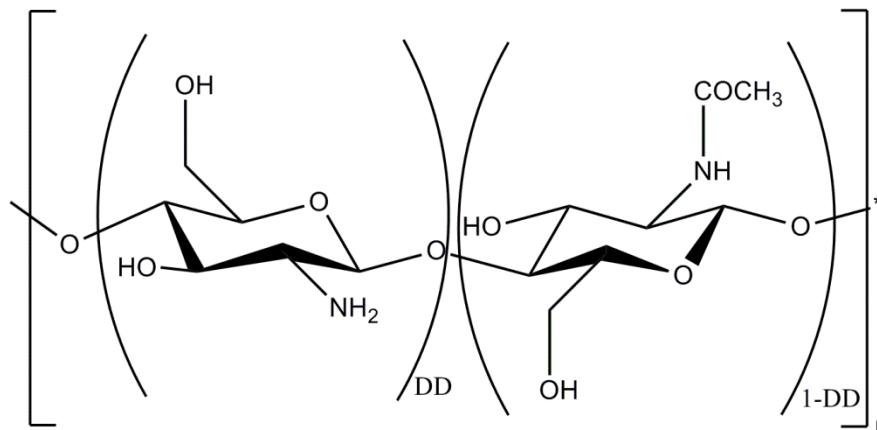


Figura 7 - Estrutura do quitosano.

O quitosano (Figura 7) é um biopolímero de origem natural [23] que resulta da desacetilação alcalina da quitina, o polímero mais abundante a seguir à celulose [73, 74]. A diferença entre os polissacarídeos, quitina e quitosano, assenta essencialmente no número de unidades de D-glucosamina e de N-acetil-D-glucosamina; se tiver mais unidades D-glucosamina é denominado quitosano, caso contrário intitula-se de quitina. Ambos os polímeros podem ser caracterizados quanto à percentagem de unidades D-glucosamina (grau de desacetilação – DD) ou de unidades N-acetil-D-glucosamina (grau de acetilação – 1-DD) [75].

A integridade da estrutura a implantar está diretamente relacionada com características intrínsecas a este polímero tais como a sua massa molecular, viscosidade, cristalinidade e distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia [76, 77]. O facto de ser um polímero não tóxico, bioaderente, biocompatível, biodegradável, osteocondutor e antibacteriano [73] tornam o quitosano numa boa aposta para a produção de ICCs para regeneração óssea comparativamente a outros polímeros utilizados em ICCs [78].

II. Procedimento Experimental

Ao longo deste capítulo descrevem-se os materiais e métodos de produção usados nas diversas etapas do trabalho experimental. Através de uma técnica baseada em microfluídica produziram-se microesferas uniformes que posteriormente deram origem aos poros na matriz do ICC. Após descrição da produção das microesferas, descreve-se detalhadamente o procedimento adotado para o empacotamento hexagonal compacto da estrutura.

Estas estruturas compactas foram posteriormente impregnadas com soluções poliméricas (quitosano) ou compósitas (quitosano e hidroxiapatite). Por último, a produção do ICC envolveu a lixiviação das esferas e a produção de uma réplica da estrutura, o que conduziu a estruturas 3D com elevada porosidade e organização.

Neste capítulo são também descritas técnicas de caracterização de amostras tais como SEM/EDS, DRX, DSC e FTIR. Por último são descritos os ensaios de compressão usados para avaliar as propriedades mecânicas dos diferentes ICCs e testes de citotoxicidade usados na validação destes materiais para aplicações biomédicas.

II.1. Técnicas de Produção

Microfluídica

Princípios básicos

Um dos fatores que mais impacto tem na integridade dos ICCs é a homogeneidade de tamanhos das partículas esféricas. A adesão, migração e proliferação celular assim como o transporte de nutrientes e metabolitos são fortemente afetados pela morfologia da estrutura, nomeadamente a interconectividade e tamanho dos poros [27, 28]. A homogeneidade dos poros é adquirida através da produção de microesferas uniformes baseada numa técnica simples de microfluídica [50].

Nesta técnica são usados dois líquidos imiscíveis que quando se encontram dão origem a uma emulsão estável óleo-em-água (O/W). Na Figura 8 é possível observar como é constituído o equipamento baseado na técnica de microfluídica usada. A bomba infusora A impulsiona a solução denominada fase contínua (FC) que se encontra, no ponto C, com a fase descontínua (FD) gerada pelo movimento da bomba infusora B. Quando as duas fases se encontram em C dão origem a uma emulsão que é colhida numa tina que contém a mesma solução que constitui a FC.

A formação da microesfera tem origem no ponto C (Figura 8) onde se forma uma gota na ponta da agulha da fase descontínua. Como inicialmente o tamanho da gota é inferior ao diâmetro interno da agulha, a força exercida pela fase contínua não é relevante. Com o aumento da gota, a força praticada pela FC é maior, resultando assim numa microesfera que é impelida para a tina através do fluxo contínuo.

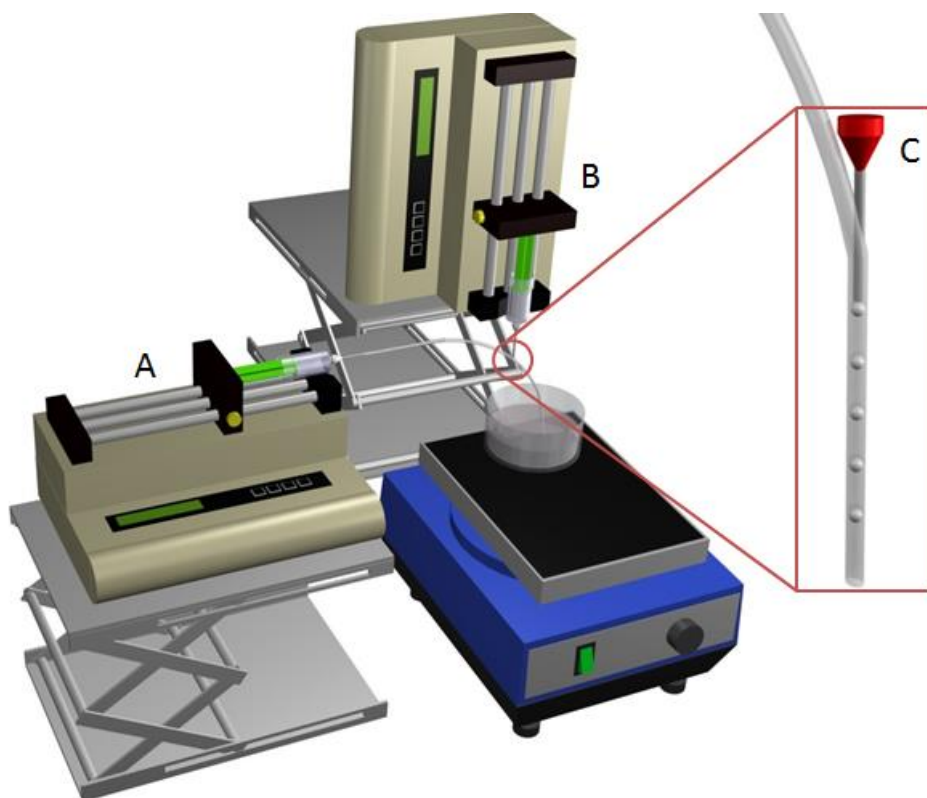


Figura 8 - Esquema de montagem da técnica baseada em microfluídica: A corresponde à fase contínua, B à fase descontínua e C ao ponto de junção das duas fases.

O produto resultante da emulsão depende do regime a que a técnica está sujeita; regime de jato que dá origem a fibras contínuas ou regime gota-a-gota que gera micropartículas esféricas. A variação dos regimes ocorre com a alteração de alguns parâmetros inerentes à técnica tais como a viscosidade das soluções, os caudais das duas fases, o diâmetro interno do capilar e a tensão superficial das soluções.

Os regimes são caracterizados pelo número de Capilar (fase contínua) e pelo número de Webber (fase descontínua). Estes dois números dependem dos materiais usados nas duas fases e no presente trabalho os materiais utilizados em ambas as fases são soluções poliméricas, nomeadamente uma solução aquosa de PVA na fase contínua e uma solução de PCL, ou PS, em diclorometano na fase descontínua.

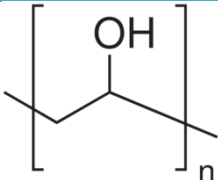
➤ Fase contínua

Na fase contínua a relação entre viscosidade (μ_c), velocidade (v_c) e tensão superficial (γ) inerentes à solução é dada pelo número de Capilar, Ca (eq. 1).

$$C_a = \frac{v_c \mu_c}{\gamma} \quad (\text{eq.1})$$

A utilização de PVA (Tabela 2) como soluto da fase contínua deve-se essencialmente ao caráter hidrofílico do mesmo. Este é um polímero não tóxico, inodoro e incolor que tem origem na hidrólise do poli(acetato de vinilo) com a remoção dos grupos acetato. A percentagem de PVA hidrolisado influencia a sua temperatura de fusão; se a hidrólise for completa a sua temperatura de fusão ronda os 230°C, se for parcial varia entre os 180-190°C [79, 80].

Tabela 2 - Características gerais do poli(álcool vinílico) (PVA).

Poli(álcool vinílico)	
	
Origem	Hidrólise de poli(acetato de vinilo)
Classe	Polímero sintético
Densidade	1,19-1,31 g/cm ³
Temperatura de fusão	T _f =180-190°C
Aplicações biomédicas	Libertação controlada de fármacos

➤ Fase descontínua

A definição do regime presente, jato ou gota-a-gota, depende da relação existente entre os números de Capilar e Webber das fases contínua e descontínua, respetivamente. A relação entre densidade (ρ_d) e caudal (v_d) da solução presente na fase descontínua, com o diâmetro interno da agulha (d_a) e a tensão superficial (γ) é dada pelo número de Webber (eq. 2).

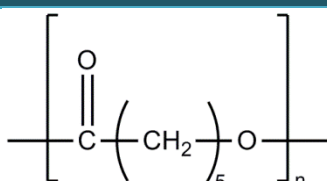
$$W_e = \frac{\rho_d d_a v_d^2}{\gamma} \quad (\text{eq.2})$$

Além destes parâmetros físicos, intrínsecos ao controlo da fase descontínua, há que ter em consideração o caráter químico da solução a ser utilizada. Para que ocorra a emulsão é necessário

que o material utilizado na FD seja hidrofóbico, na medida que a partir do momento que entra em contacto com a fase contínua, com carácter hidrofílico, origine as microesferas. Neste trabalho abordam-se dois tipos de polímeros hidrofóbicos, nomeadamente o policaprolactona (PCL) e o poliestireno (PS), como solutos da fase descontínua.

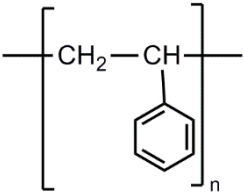
O polímero policaprolactona (Tabela 3) consiste num poliéster alifático semicristalino, biocompatível e biodegradável [23, 81]. O PCL apresenta uma temperatura de transição vítrea $T_g = -60^\circ\text{C}$ e uma temperatura de fusão $T_f \approx 59-64^\circ\text{C}$ dependendo do peso molecular do polímero [79, 82, 83, 84, 85].

Tabela 3 – Caraterísticas gerais do policaprolactona (PCL).

Policaprolactona	
	
Origem	Abertura do anel cíclico do monómero caprolactona
Classe	Polímeros sintéticos biodegradáveis
Densidade	1,145 g/cm ³
Temperatura de fusão	$T_f = 59-64^\circ\text{C}$
Temperatura de transição vítrea	$T_g = -60^\circ\text{C}$
Aplicações biomédicas	Aplicações ortopédicas, suturas e libertação prolongada de fármacos.

Um outro polímero utilizado na produção de microesferas para fabrico de ICCs é o poliestireno (Tabela 4). Trata-se de um polímero sintético não biodegradável que apresenta carácter termoplástico, ou seja, é sólido à temperatura ambiente, e facilmente se deforma por aquecimento, retornando ao estado sólido após arrefecimento. Esta característica tão específica deste tipo de materiais deve-se à sua temperatura de transição vítrea ($T_g = 100-116^\circ\text{C}$) que é inferior à temperatura a partir da qual o polímero se degrada ($T = 240^\circ\text{C}$), ou seja, neste intervalo de temperaturas o polímero atinge uma viscosidade tal que é possível adaptá-lo à estrutura desejada [86-89].

Tabela 4 – Características gerais do poliestireno (PS).

Poliestireno	
	
Origem	Homopolímero resultante da polimerização do monómero estireno
Classe	Polímeros termoplásticos
Densidade	1,06 g/cm ³
Temperatura de transição vítrea	T _g = 100-116°C
Aplicações biomédicas	Prótese dentária, equipamentos de teste de diagnóstico, materiais em investigação biomédica (placas de petri e tubos de ensaio)

Materiais e Métodos

A fase contínua provém de uma bomba infusora KDS-100-CE que injeta uma solução de 2% m/m de PVA (M_w ≈ 9500, hidrólise 95%, Acros Organics) em H₂O destilada, contida numa seringa B.Braun de 20mL, para um tubo de PVC através de uma agulha 18G. A fase descontínua é introduzida no tubo de PVC através de uma agulha 25G e consiste numa solução de 2% m/m de PCL (M_n ≈ 70000-90000, Aldrich) em diclorometano (CH₂Cl₂, Fluka), também esta numa seringa de 20 mL.

Para a produção de microesferas de poliestireno é utilizada uma solução a 5% m/m de poliestireno (M_w ≈ 350000, Aldrich) em diclorometano na fase descontínua, para uma fase contínua de 5% m/m de PVA em H₂O destilada.

A junção das duas fases dá origem a uma emulsão que resulta em microesferas de tamanhos uniformes que podem ser controlados e ajustados de acordo com o caudal da fase contínua bem como com a concentração de polímero na fase descontínua. Uma diminuição do caudal da fase contínua e/ou um aumento de percentagem de polímero na fase descontínua promoverá um aumento de tamanho das microesferas.

Após a formação da microesfera na ponta da agulha da FD, esta é expelida do tubo de PVC para uma tina com uma solução coletora igual à solução da fase contínua; as esferas são deixadas num agitador orbital (bioSan OS 20) durante a noite a 100 rpm, com o intuito de evaporar o solvente (diclorometano).

Em seguida as microesferas são colocadas num sistema de peneiração (Retsch, 212 μm , 250 μm e 300 μm) (Figura 9) sobre um agitador de peneiros (Fritsch) durante 15 minutos a uma amplitude de 6 e são recolhidas para posterior utilização.

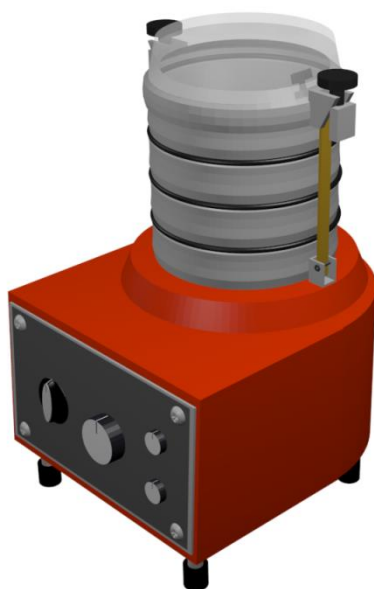


Figura 9 - Sistema de agitação de peneiros.

A análise morfológica das microesferas é realizada através de microscópio ótico (Nikon Eclipse LV100) em que se utilizam 100 amostras aleatórias de cada produção para o efeito; é efetuada a medição dos diâmetros com o auxílio de um programa para processamento de imagem (ImageJ™). Posteriormente a análise morfológica da superfície das microesferas é observada em SEM (modelo Zeiss DSM-962).

Produção dos Cristais Coloidais

Princípios básicos

A necessidade de produzir uma matriz por empacotamento hexagonal compacto das microesferas (CC – *Colloidal Crystals*) resulta da importância de produzir um *scaffold* com uma estrutura mais organizada e que apresente melhores propriedades mecânicas e interconectividade entre poros do que estruturas desorganizadas de igual porosidade. Como tal, as microesferas são submetidas a uma temperatura promotora do *annealing* (i.e. promotora da junção entre as esferas), que

posteriormente dão lugar às cavidades circulares. Deste modo a estrutura 3D resultante, o ICC, apresenta elevada porosidade e poros interconectados.

O grau de empacotamento das microesferas está diretamente relacionado com a temperatura de *annealing* a que estas estão sujeitas; quanto maior for a temperatura de *annealing*, maior será a ponte de ligação entre microesferas consecutivas. O interesse de controlar o diâmetro destas ligações está relacionado com o espaço que as células (osteoblastos) necessitam para migrar na estrutura sem bloquear os poros.

Neste trabalho é desenvolvido um ICC para substituição óssea e, como tal, os osteoblastos com diâmetros de aproximadamente 20-30 μm serão as células a usar no estudo da interação célula-biomaterial.

Materiais e métodos

Numa balança (Mettler Toledo AG204) pesam-se 40 mg de microesferas e que se colocam dentro de um poço do molde (Figura 10). Em seguida adicionam-se, com o auxílio de uma micropipeta (Gilson P200), 150 μl de Etanol (Fisher Chemical, pureza 99,9%) a cada um dos poços.

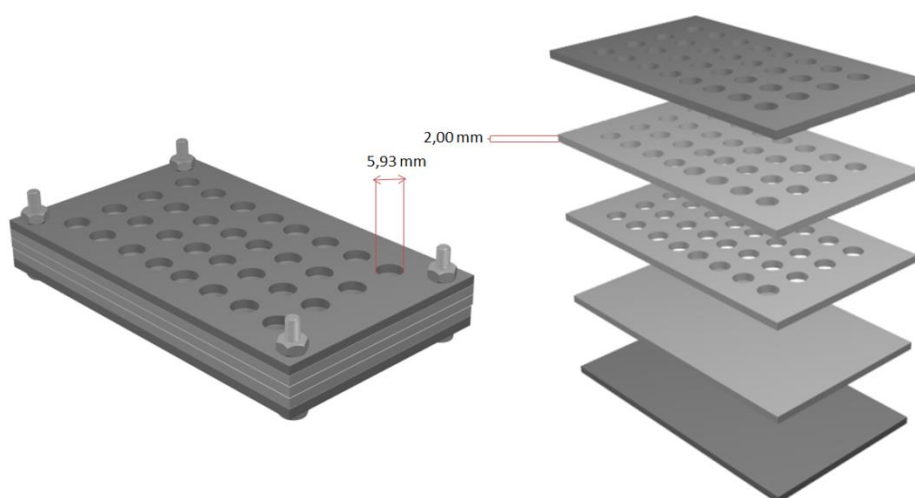


Figura 10 – Representação esquemática do molde de 32 poços para formação dos CCs. Cada poço possui um diâmetro de 5,93 mm e a altura do poço cerca de 4,00 mm.

O molde é colocado num banho de ultrasons (Bandelin Sonorex Super RK 510H) durante 10 minutos e posteriormente num agitador orbital (bioSan OS 20) durante 1 hora com o intuito de promover o empacotamento hexagonal compacto das microesferas.

Após o passo anterior estar concluído, o molde é introduzido numa estufa (Memmert) a 40°C durante 24 horas para garantir uma evaporação controlada do etanol, e por fim a uma temperatura

entre 120-130°C durante 4 horas para promover o *annealing*. As amostras são retiradas do molde e reservadas para posterior visualização em SEM e produção do ICC.

Produção de Nanocristais de Hidroxiapatite

Princípios básicos

A fase mineral óssea é composta por nanocristais de hidroxiapatite carbonatada, denominados bastonetes. A maturação destes nanocristais ocorre segundo um eixo longitudinal que dá origem a nanopartículas com um diâmetro de aproximadamente 20 nm e um comprimento de 40-200 nm. Nesta etapa do trabalho experimental pretende-se recriar a morfologia dos bastonetes de hidroxiapatite recorrendo à nucleação dos nanocristais numa solução aquosa supersaturada.

Materiais e Métodos

Seguindo o trabalho de Chen e seus colaboradores [90], cerca de 1g de hidroxiapatite ($\text{HCa}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$, $\geq 90\%$ Sigma-Aldrich) é pesada numa balança (Mettler Toledo AG204) e posteriormente é adicionada a 500 ml de H_2O destilada. A suspensão é colocada sob agitação magnética (Agimatic-N) e é adicionado ácido nítrico (HNO_3 , $\geq 65\%$, Panreac) até o pó estar completamente dissolvido; após dissolução completa da hidroxiapatite, o pH da solução é medido (ROTH) e ajustado para $\text{pH}=2$ através da adição de HNO_3 . A solução resultante possui uma razão estequiométrica $\text{Ca/P}=1,67$ correspondente à hidroxiapatite pura.

Para promover a nucleação e o crescimento dos bastonetes de hidroxiapatite, é adicionado, gota-a-gota, hidróxido de amónia (NH_3 , 25%, Panreac) com constante agitação, até obtenção de uma solução aquosa supersaturada com $\text{pH} \approx 9$. Posteriormente, a solução é colocada numa estufa (Memmert) a 37°C durante 3 dias, sendo que a variação do pH, temperatura e duração da incubação são fatores determinantes nas dimensões dos bastonetes de hidroxiapatite [90].

A solução é centrifugada durante 10 minutos a 10000 rpm numa centrifuga (Heraeus, Multifuge X1R, Thermo Scientific), findo o qual é desprezado o sobrenadante e adicionada H_2O destilada; este passo é repetido quantas vezes necessárias até que o pH do sobrenadante seja aproximadamente 7. Em seguida a solução é colocada a liofilizar (Vaco 2, Zirbus) durante 24 horas com o objetivo de retirar a água da amostra, obtendo-se deste modo os bastonetes de hidroxiapatite em pó.

Para uma análise morfológica em SEM a amostra é suspensa em metanol (CH_3OH , 99,6%, Merck) numa concentração 10% m/m para promover a dispersão dos nanocristais de HA.

Impregnação do CC

Após produção das microesferas e do seu empacotamento hexagonal estas são impregnadas com um biomaterial ou uma conjugação de biomateriais. Como tal são utilizadas diferentes soluções para impregnação do CC (Figura 11).

A impregnação do CC é feita com soluções de quitosano (Cs) (\approx Mw 500000, DD 75-85%, Aldrich) a 3% (m/v) em 200 mM de ácido acético glacial (CH_3COOH , 99,7%, Panreac) ou com suspensões de nanocristais de hidroxiapatite nestas mesmas soluções (suspensões compósitas). Neste trabalho são abordados três tipos de materiais compósitos e um material polimérico, cuja única variação é a percentagem de nanocristais de hidroxiapatite na solução a utilizar para impregnação.

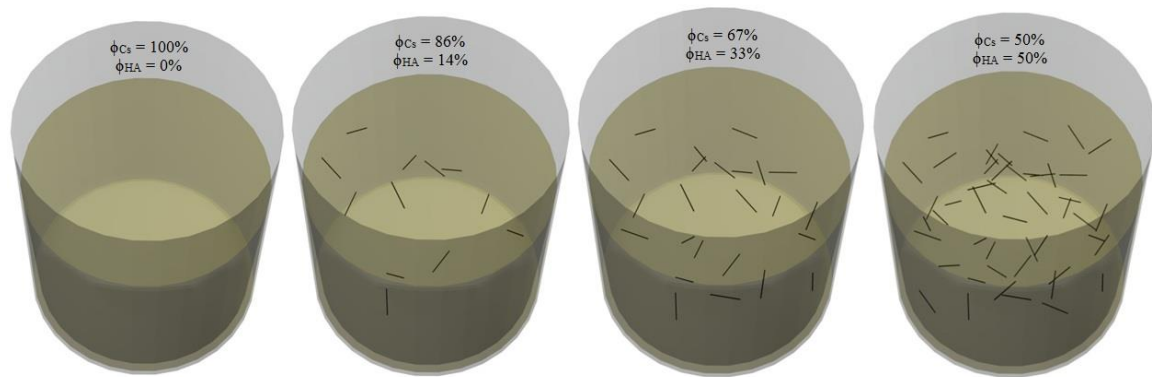


Figura 11 - Esquema das soluções usadas para impregnação do CC. É de notar que a representação dos bastonetes de hidroxiapatite é meramente ilustrativo pois estes têm uma dimensão na ordem dos nanómetros não sendo possível a sua observação a olho nu.

As soluções de impregnação correspondem a uma mistura de sólidos, nomeadamente quitosano/hidroxiapatite, em que as suas frações volúmicas são dadas por:

$$\phi_{Cs} = \frac{V_{Cs}}{V_{Cs} + V_{HA}}$$

e

$$\phi_{HA} = \frac{V_{HA}}{V_{Cs} + V_{HA}}$$

Atendendo a que a densidade do quitosano segundo Hsieh [91] é:

$$\rho_{Cs} = 1,342 \text{ g/cm}^3$$

E a densidade dos bastonetes de hidroxiapatite é calculada segundo o método de Arquimedes [92], utilizando uma pastilha prensada de bastonetes de HA:

$$\rho_{HA} = \frac{m_{HA}}{V_{HA}} = 2,7342 \text{ g/cm}^3$$

Para um volume total preparado para futura impregnação dos CC ($V_t = 10\text{mL}$), obtêm-se as frações volúmicas dos sólidos para cada amostra (Tabela 5).

Tabela 5 – Cálculo da fração volúmica de acordo com a Lei das Misturas para cada amostra. Amostra A: $\Phi_{Cs} = 1,00$ e $\Phi_{HA} = 0,00$; Amostra B: $\Phi_{Cs} = 0,86$ e $\Phi_{HA} = 0,14$; Amostra C: $\Phi_{Cs} = 0,67$ e $\Phi_{HA} = 0,33$; Amostra D: $\Phi_{Cs} = \Phi_{HA} = 0,50$.

Amostra	$V_t = 10 \text{ mL}$	Solução	Massa	Densidade	Volume	Fração Volúmica
	Sólidos	%	m	ρ	V	Φ
		(m/v)	(mg)	(g/cm^3)	(mL)	–
A	Quitosano	3%	300	1,342	0,224	1,00
	Hidroxiapatite	0%	0	2,734	0,000	0,00
B	Quitosano	3%	300	1,342	0,224	0,86
	Hidroxiapatite	1%	100	2,734	0,037	0,14
C	Quitosano	3%	300	1,342	0,224	0,67
	Hidroxiapatite	3%	300	2,734	0,110	0,33
D	Quitosano	3%	300	1,342	0,224	0,50
	Hidroxiapatite	6%	600	2,734	0,219	0,50

Posteriormente são selecionados cinco CCs e são colocados cada um num poço de uma placa de 24 poços. Cada uma das soluções/suspensões da Figura 11 é vertida sobre um CC até que a superfície do mesmo esteja totalmente coberta. A placa de poços é colocada no exsiccador que está ligado a uma bomba de vácuo e é iniciada a remoção do ar do sistema. É através da consecutiva remoção e introdução de ar no sistema que os CCs ficam impregnados. Este passo é repetido quantas vezes forem precisas até não se observar qualquer bolha de ar a sair das soluções/suspensões.

Quando este passo se encontrar concluído os CCs impregnados são retirados das soluções e pousados em papel de filtro com vista a retirar o excesso de solução/suspensão. São então colocados num congelador e reservados para posterior liofilização.

Obtenção do ICC

Os CCs anteriormente impregnados são colocados num liofilizador (Vaco 2, Zirbus) durante 24 horas num sistema de vácuo de aproximadamente 0,050 mbar e posteriormente colocados em etanol absoluto (C_2H_6O , 99,99%, Fisher Chemical) durante 1 hora. Visto as microesferas de poliestireno (ou policaprolactona) serem solúveis em diclorometano, este é o solvente utilizado para retirar as microesferas da estrutura do CC dando origem ao ICC. Assim as microesferas são colocadas em diclorometano (CH_2Cl_2 , Fluka) durante a noite, e em seguida o ICC resultante é colocado 1 hora em etanol e 1 hora em água para alterar o meio. Todo o processo de lavagem do ICC é realizado com o auxílio de um Soxhlet que promove uma corrente contínua de solução de lavagem e consequentemente o arrastamento de material indesejado no ICC (neste caso, o diclorometano arrasta o poliestireno constituinte das microesferas). O ICC é liofilizado mais uma vez para retirada da água da amostra e assim obter uma estrutura coesa que pode ser polimérica ou compósita.

II.2. Técnicas de Caracterização

Calorimetria Diferencial de Varrimento/Termogravimetria (DSC/TG/DTA)

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC - Differential scanning calorimetry) é uma técnica de caracterização térmica dos materiais que permite determinar as temperaturas de transformação e entalpias ou variações de calor específico das mesmas. Por outro lado a perda de massa devido ao aumento da temperatura, que conduz à evaporação do solvente residual e à degradação por pirólise, é medida por termogravimetria (TG - Termogravimetry). Quando a amostra em questão sofre uma transformação de fase, absorve mais ou menos calor de acordo com a cristalinidade do material [93]. O aparelho utilizado neste trabalho foi o NETZSCH modelo STA 449F3.

Esta técnica de caracterização é empregue neste trabalho para avaliar a temperatura de transição vítrea e a temperatura de fusão dos polímeros poliestireno e policaprolactona.

Microscopia Eletrónica de Varrimento/Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia (SEM/EDS)

Na microscopia eletrónica de varrimento (SEM - Scanning Electronic Microscopy) um feixe de eletrões altamente energético interage com uma amostra condutora com o objetivo de dar a conhecer a morfologia do material a analisar [94]. Alguns dos eletrões da amostra recebem do feixe inicial energia para saltar para níveis de energia mais altos (sem serem emitidos da amostra) e, ao regressarem aos níveis de energia mais baixos emitem energia na forma de raios-X que é

captada por detetores. Esta energia é recolhida pelo equipamento de EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*) onde são analisados os picos de raios-X que variam de intensidade de acordo com a energia libertada pelos eletrões de cada átomo. Foram utilizados dois equipamentos de SEM/EDS nomeadamente o modelo *Zeiss DSM-962* e o modelo *Zeiss Auriga*.

Atendendo a que todas as amostras, deste trabalho, a observar em SEM, nomeadamente microesferas, bastonetes de hidroxiapatite e o ICC, são constituídas por materiais não condutores, surge a necessidade de revesti-las por uma fina camada de ouro. Assim, é feita uma deposição de ouro (espessura de 8 nm) através de um aparelho de *sputtering* durante 30 segundos a uma taxa de deposição de 3 Å/s. Durante a observação das amostras a tensão aplicada para promover a aceleração dos eletrões é de 5kV.

Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) consiste numa técnica de análise qualitativa dos materiais que determina a composição química das amostras. Fornece um espectro de transmissão (ou absorção) da radiação de infravermelho na amostra em estudo em que os grupos funcionais das amostras são identificados através de picos que correspondem à frequência de vibração das ligações constituintes do material em estudo. O espectrómetro utilizado neste trabalho é o FTIR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation com o sistema de ATR (*Attenuated total reflectance*) para análise de pós.

Para a obtenção do espectro de transmissão da amostra, é inicialmente realizada uma aquisição de *background*, correspondente à linha de base, para desprezar qualquer composto exterior à amostra em estudo. Posteriormente a amostra é colocada no porta-substratos e a radiação que é transmitida através da mesma é recolhida e analisada [95].

O FTIR foi utilizado para avaliar a composição química de amostras de HA comercial e dos nanocristais de hidroxiapatite.

Difração de Raios-X (DRX)

A técnica de difração de Raios-X fornece informação sobre a estrutura cristalina do material. Esta técnica reside essencialmente no fato de o comprimento das ondas de raios-X ser semelhante à distância entre planos atômicos, resultando em picos quando o feixe incide na rede cristalina do material e promove fenómenos de difração e interferência [96]. Neste trabalho o equipamento de DRX utilizado é o difractorómetro *X'Pert PRO* da *PANalytical*.

Recorreu-se à técnica de DRX para analisar a cristalinidade da hidroxiapatite comercial, bem como dos nanocristais de hidroxiapatite produzidos.

Propriedades Mecânicas - Ensaios de compressão

As propriedades mecânicas de um material são determinadas através de ensaios em que o material fica sujeito a diferentes esforços mecânicos; a resistência que um material oferece à tensão aplicada depende essencialmente da natureza, estrutura e morfologia do material.

No caso de materiais porosos, neste caso o ICC, são utilizados ensaios de compressão. Nestes ensaios é aplicada uma força de compressão perpendicular à superfície do material, que resulta numa deformação progressiva da estrutura; como tal, há uma relação entre a força exercida por unidade de área (tensão aplicada), e a variação na espessura da amostra devido à deformação produzida.

Neste trabalho foi utilizado o equipamento *Rheometric Scientific* (Minimat Firmware 3.1) para realização dos testes de compressão aos ICCs com uma célula de carga de 20 N e uma velocidade de 0,1 mm/min.

Testes de Citotoxicidade

Princípios básicos

Uma vez que este trabalho visa a incorporação dos ICCs em meio biológico como preenchimento de defeitos ósseos é necessária a verificação dos seus efeitos citotóxicos em células animais. A citotoxicidade pode ser estimada pelo método de avaliação indireto do eventual caráter nocivo do material: este é colocado em meio de cultura que posteriormente estará em contacto com células semelhantes às células do tecido a regenerar. No âmbito deste trabalho são utilizados osteoblastos de origem humana da linha celular Saos-2.

Materiais e métodos

Inicialmente é preparado o meio de cultura (McCOY'S 5A MEDIUM) (ver anexo A) e adicionados o soro fetal bovino (10%) e os antibióticos penicilina e estreptomicina (1% V/V) ao mesmo; em seguida são descongeladas células da linha celular Saos-2 e colocadas em contacto com o meio previamente preparado. A preparação de cultura de células animais segue um protocolo (ver anexo B) que é adotado neste trabalho.

Num ambiente esterilizado, nomeadamente numa câmara de fluxo laminar (ESCO Labculture), são colocados os ICCs em contacto com o meio de cultura, numa placa de 48 poços (Figura 12).

São utilizadas três amostras de cada tipo de material, ou seja para diferentes frações volúmicas de hidroxiapatite ($\phi_{Cs} = 1,00$; $\phi_{Cs} = 0,86$ e $\phi_{HA} = 0,14$; $\phi_{Cs} = 0,67$ e $\phi_{HA} = 0,33$; $\phi_{Cs} = \phi_{HA} = 0,50$), de modo a assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Numa primeira fase, os ICCs são colocados nos poços que contêm o índice “M” de meio de cultura (porção inferior da placa), e as células são semeadas na porção superior da placa (índice “C”) numa concentração de $3,7 \times 10^4$ células/cm². Os poços de controlo do meio C_M são, como o nome indica, um termo de comparação entre a variação das amostras e o meio, pelo que é apenas constituído pela solução do meio de cultura; em todos os poços são colocados 500 µl de meio.

O controlo negativo C₋ e positivo C₊ servem de referência do meio de cultura em contacto com as células sem contacto prévio com os materiais. É adicionado DMSO (Dimetilsulfóxido, > 99,9%, MERK) ao controlo C₊ para matar as células do poço. Devido ao carácter citotóxico do DMSO mais de 90% das células viáveis do controlo C₊ acabam por morrer.

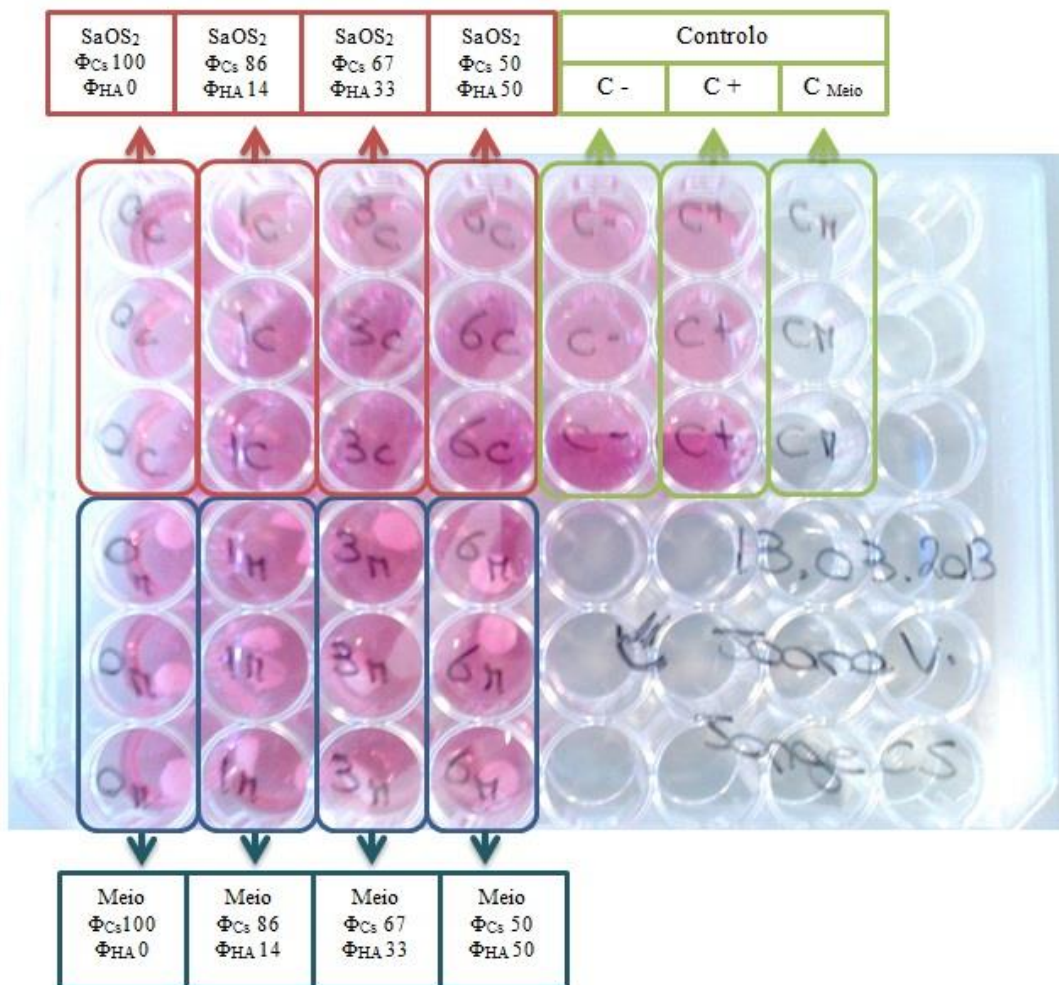


Figura 12 - Placa de 48 poços para testes de citotoxicidade dos ICCs. (Legenda azul – poços com meio de cultura em contacto com os ICCs; legenda vermelha – poços com células Saos-2 e meio; legenda verde – poços de controlo das células, C₋ e C₊, e do meio de cultura C_M).

Neste trabalho é realizada uma análise citotóxica dos materiais pelo método indireto, visto que é analisada a resposta das células ao meio de cultura que esteve em contacto com o material, ou seja, as células nunca estão em contacto direto com o próprio material. Assim, o meio de cultura que esteve em contacto com as células (índice “C”) é retirado e substituído pelo meio de cultura que esteve em contacto com os ICCs (índice “M”); na prática o meio de cultura que esteve em contacto com os ICCs sofre uma translação vertical de três poços (Figura 12).

Por fim, para medir as densidades óticas das soluções com o auxílio de um leitor de microplacas Tecan Infinite M200, adiciona-se o reagente PrestoBlue™ 10% V/V em relação ao meio. Este reagente consiste numa solução de resazurina que as células vivas metabolizam e transformam em resorufina provocando alteração da cor e da fluorescência da solução. Ou seja, se os materiais, nomeadamente os ICCs, não forem citotóxicos, o meio que esteve em contacto com eles também não será citotóxico e conseqüentemente as células permanecerão viáveis.

III. Análise de Resultados

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer do trabalho desenvolvido. Para obtenção de um ICC como substituinte ósseo sintético, objetivo fundamental deste trabalho, diferentes estudos foram realizados.

Inicialmente é desenvolvido um estudo da variação do tamanho e morfologia das microesferas e de que maneira influenciam a futura porosidade do ICC. Em seguida, o empacotamento hexagonal compacto é analisado do ponto de vista morfológico.

Por fim, é obtido o ICC e, para além de uma caracterização morfológica, é analisado o seu comportamento tendo em conta as suas propriedades mecânicas bem como a viabilidade celular ao ICC, de acordo com a sua natureza, polimérica ou compósita.

III.1. Microfluídica

No estudo da microfluídica é dada especial atenção à variação do tamanho das microesferas controlando dois parâmetros: a viscosidade da solução da fase descontínua, e o caudal da fase contínua. A importância de controlar estes parâmetros prende-se com o facto de existirem dois regimes distintos, jato ou gota-a-gota, que dependem essencialmente da combinação dos parâmetros acima mencionados. Neste trabalho são produzidas microesferas de dois polímeros, o policaprolactona e o poliestireno, em que o ajuste dos parâmetros inerentes à produção depende da natureza intrínseca dos polímeros.

Policaprolactona (PCL)

Como visto anteriormente (eq. 1), o número de Capilar, C_a , está relacionado com a fase contínua e o número de Webber, W_e , com a fase descontínua. Atendendo à variação de alguns parâmetros no decorrer do trabalho calculou-se C_a e W_e para confirmação do regime presente. Na Tabela 6 e na Tabela 7 são apresentados os valores calculados para o número de Capilar e número de Webber, respetivamente.

Considerando que a relação existente entre C_a e W_e define o regime presente no sistema é possível afirmar que o regime utilizado, quando comparado com a bibliografia [97], é o regime gota-a-gota. Na Figura 16 é possível observar a azul o intervalo de resultados do número de Capilar e número de Webber das soluções usadas neste trabalho.

Tabela 6 - Número de Capilar para uma fase contínua de PVA a 2% m/m e a diferentes caudais.

Fase Contínua	Diâmetro interno da agulha (d_a)	PVA (m/m)	Viscosidade da solução (μ_c)	Tensão superficial (γ)	Caudal (v_c)	Número Capilar (C_a)
	0,84 mm	2%	$5,281 \times 10^{-3}$ Pa.s	56,2 mN/m	50 ml/h	$4,6 \times 10^{-3}$
					80 ml/h	$7,5 \times 10^{-3}$
					120 ml/h	$11,3 \times 10^{-3}$
					140 ml/h	$13,2 \times 10^{-3}$

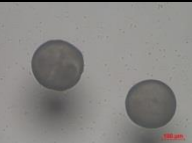
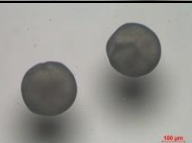





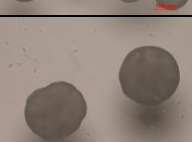

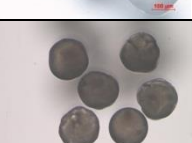
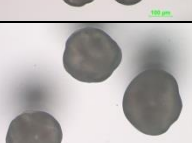
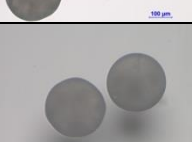
Tabela 7 - Número de Webber para uma fase descontínua de PCL a 2%, 5% e 7% m/m.

Fase Descontínua	Diâmetro interno da agulha (d_a)	PCL (m/m)	Densidade da solução (ρ_d) g/cm ³	Tensão superficial (γ)	Caudal (v_d)	Número de Weber (W_e)
	0,25 mm	2%	1,29	27,3mN/m	3 ml/h	$1,06 \times 10^{-1}$
		5%	1,17	29,3mN/m		$9,0 \times 10^{-2}$
		7%	1,15	29,0mN/m		$8,9 \times 10^{-2}$

O estudo das microesferas de PCL foi realizado tendo em conta a variação e combinação de alguns parâmetros de acordo com a Tabela 8. Para a mesma concentração de PVA, 2% m/m em H₂O, efetuaram-se variações a nível do caudal da fase contínua, nomeadamente 50 ml/h, 80 ml/h, 120 ml/h e 140 ml/h, e na percentagem de polímero na fase descontínua, 2%, 5% e 7% m/m. Os diâmetros das microesferas variam, aproximadamente, entre os 170 μ m e os 370 μ m com desvios padrão (DP) inferiores a 10% para todos os ensaios efetuados. Quanto maior o tamanho das microesferas menor a simetria esférica das mesmas, possivelmente resultado da fricção entre as microesferas e o tubo de PVC. O estudo da variação do tamanho das microesferas foi completado com uma análise gráfica apresentada na Figura 13. É de notar que um aumento do caudal da fase contínua resulta numa diminuição do tamanho das microesferas. Por outro lado, para um caudal constante, o aumento da percentagem de polímero PCL, na fase descontínua promove um aumento do tamanho das esferas.

As microesferas que apresentaram melhor relação entre simetria esférica, rapidez do processo e poupança de recursos são as microesferas correspondentes ao ensaio com uma fase contínua de 120 ml/h para uma percentagem de PCL de 5% m/m.

Tabela 8 - Estudo da variação das condições de produção de microsferas de PCL (FC- fase contínua; FD – fase descontínua; DP – desvio padrão). A ampliação usada é de 100x.

FC (ml/h)	FD (ml/h)	PVA (m/m)	PCL (m/m)	Nome	Diâmetro (μm)	DP	DP (%)	Imagem
50	3	2%	2%	PCL_2% FC50FD3	223,2	9,0	4,0	
			5%	PCL_5% FC50FD3	298,3	8,3	3,7	
			7%	PCL_7% FC50FD3	370,8	27,4	7,4	
80			2%	PCL_2% FC80FD3	177,9	10,0	5,6	
			5%	PCL_5% FC80FD3	283,3	10,1	3,6	
			7%	PCL_7% FC80FD3	315,8	12,0	3,8	
120			2%	PCL_2% FC120FD3	176,6	8,4	4,8	
			5%	PCL_5% FC120FD3	266,1	8,1	3,3	
			7%	PCL_7% FC120FD3	298,9	8,9	3,0	
140	2%	PCL_2% FC140FD3	175,9	6,2	3,5			
	5%	PCL_5% FC140FD3	249,3	11,4	4,6			
	7%	PCL_7% FC140FD3	265,2	7,1	2,7			

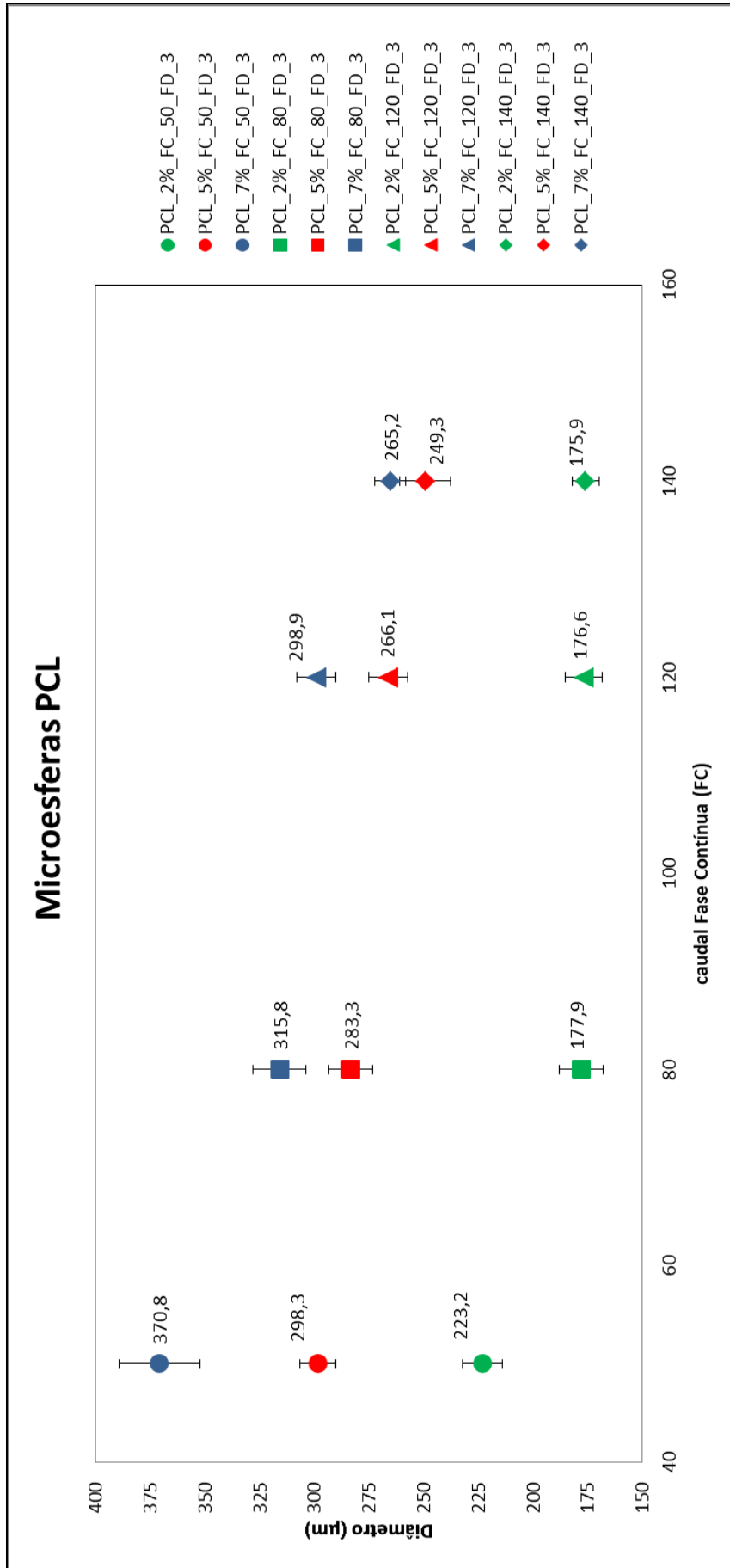


Figura 13 - Gráfico do estudo da variação das condições de produção de microesferas de PCL (FC- fase contínua; FD – fase descontínua).

As microsferas de PCL correspondentes a uma fase contínua de PVA 2% m/m com um caudal de 120 ml/h, e uma fase descontínua de PCL 5% m/m com um caudal de 3 ml/h foram observadas em SEM (Figura 14); as microsferas apresentavam um diâmetro na ordem dos 250 μm e simetria esférica.

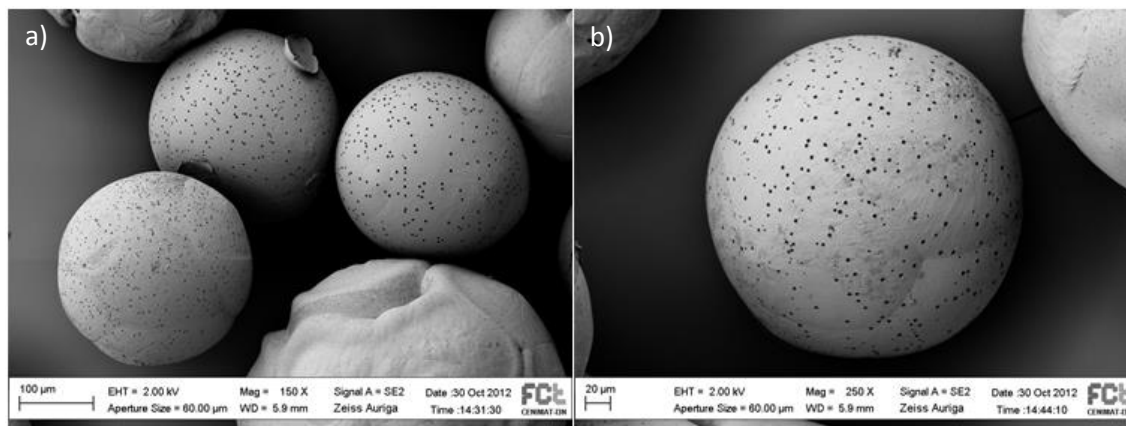


Figura 14 - Observação em SEM de microsferas de PCL: a) Ampliação de 150x para observação da uniformidade dos tamanhos; b) Ampliação de 250x para observação da superfície das microsferas.

Tendo em conta que as microsferas foram utilizadas para produção do ICC, e um dos passos intermédios da conceção envolve o empacotamento das mesmas através do aquecimento e difusão do polímero, foi necessário analisar o comportamento térmico do polímero policaprolactona, de forma a determinar as temperaturas de *annealing* ideais.

O termograma de DSC do PCL usado é apresentado na Figura 15. O PCL é um polímero semicristalino com temperatura de transição vítrea sub-ambiente que não foi aqui avaliada. A temperatura de fusão do PCL usado é de $T_f = 65,7\text{ }^\circ\text{C}$ e a esta transição está associada uma entalpia de $\Delta H_f = 55,73\text{ J/g}$.

Uma consequência direta da fusão do PCL é a dificuldade em controlar o empacotamento das microsferas. Se por um lado a temperatura for ligeiramente abaixo da temperatura de fusão do polímero não ocorre qualquer tipo de *annealing* entre microsferas vizinhas, mas por outro se for ligeiramente acima ocorre a total fusão do PCL resultando num filme polimérico.

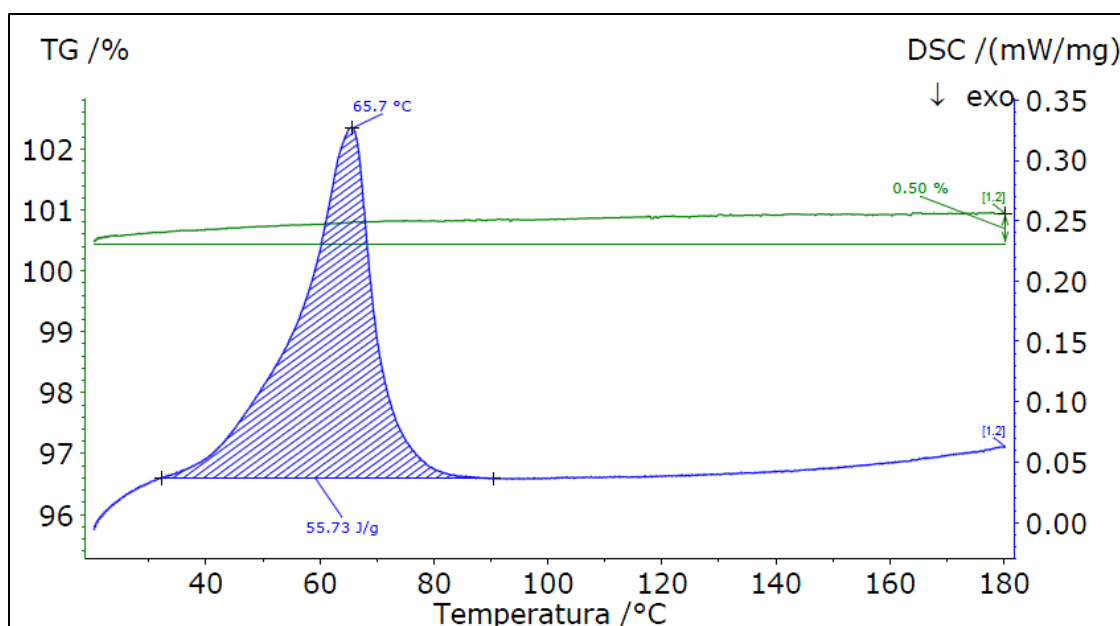


Figura 15 - Termograma de DSC do PCL.

A dificuldade em controlar este comportamento semicristalino do PCL levou à utilização de um polímero amorfo, o poliestireno, que apresenta uma temperatura de transição vítrea a partir da qual é possível ‘moldar’ as microesferas e deste modo obter um CC.

Poliestireno (PS)

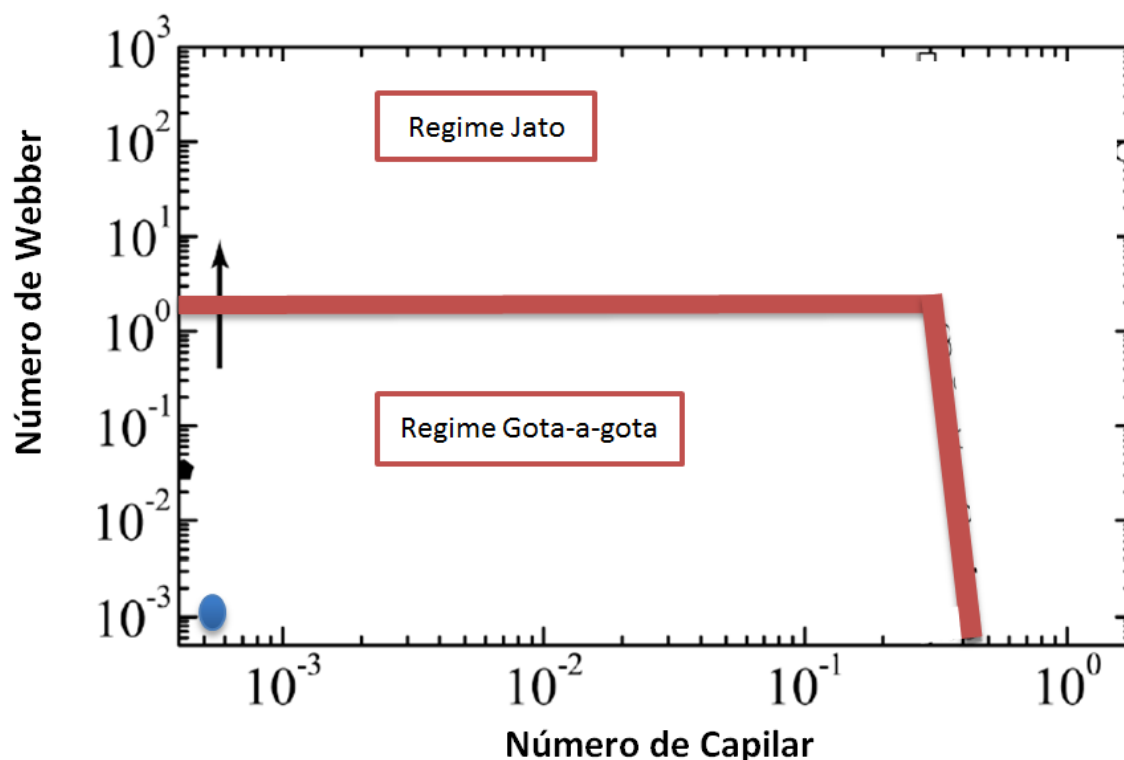
No que respeita à produção de microesferas de poliestireno também foi calculado o número de Capilar e o número de Webber para as fases contínua e descontínua respetivamente, com o intuito de confirmar o regime presente. São apresentados nas Tabelas 9 e 10 os resultados correspondentes à fase contínua e à fase descontínua, respetivamente. Mais uma vez é confirmada a presença do regime gota-a-gota, neste caso na produção de microesferas de poliestireno (Figura 16).

Tabela 9 - Número de Capilar para uma fase contínua de PVA a 5% m/m e a diferentes caudais.

	Diâmetro interno da agulha (d_a)	PVA (m/m)	Viscosidade da solução (μ_c)	Tensão superficial (γ)	Caudal (v_c)	Número Capilar (C_a)
Fase Contínua	0,84 mm	5%	$4,9 \times 10^{-2}$ Pa.s	54,2 mN/m	10 ml/h	$9,0 \times 10^{-3}$
					20 ml/h	$18,1 \times 10^{-3}$
					30 ml/h	$27,1 \times 10^{-3}$
					40 ml/h	$36,2 \times 10^{-3}$
					50 ml/h	$45,2 \times 10^{-3}$

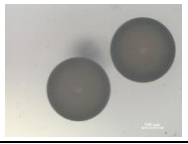
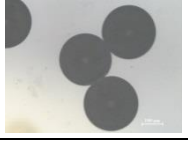


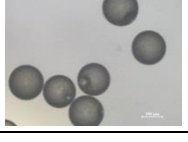
Tabela 10 - Número de Weber para uma fase descontínua de PS a 5% m/m.

Fase Descontínua	Diâmetro interno da agulha (d_a)	PS (m/m)	Densidade da solução (ρ_d) g/cm^3	Tensão superficial (γ)	Caudal (v_d)	Número de Weber (W_e)
	0,25 mm	5%	1,2102	29,5 mN/m	3 ml/h	$9,23 \times 10^{-2}$

**Figura 16** - Relação entre número de Capilar e número de Weber para transições de regime de jato para gota-a-gota. (adaptado de [97]). O círculo a azul representa o intervalo de resultados das microesferas de PCL e de PS.

A variação do tamanho das microesferas com a alteração do caudal da fase contínua também foi estudada. É de notar que para o poliestireno, a concentração de polímero na fase contínua é também alterada, nomeadamente para PVA 5% m/m. Para PVA 2% m/m e com os caudais da FC semelhantes aos utilizados para a produção de microesferas de PCL, formam-se microesferas com diâmetros idênticos ao primeiro caso em estudo; contudo, a agregação das microesferas de PS aquando da produção tornou-se um problema recorrente. Como tal optou-se por um aumento de concentração de polímero da fase contínua (PVA 5% m/m) e conseqüentemente, uma diminuição dos caudais para obtenção de microesferas com diâmetros na mesma ordem de grandeza que as microesferas de PCL.

Tabela 11 - Estudo da variação das condições de produção de microesferas de PS (FC- fase contínua; FD – fase descontínua; DP – desvio padrão). A ampliação utilizada foi de 100x.

FC (ml/h)	FD (ml/h)	PVA (m/m)	PS (m/m)	Nome	Diâmetro (μm)	DP	DP (%)	Imagem
10	3	5%	5%	PS_5% FC10FD3	316,7	15,4	4,9	
20				PS_5% FC20FD3	261,5	11,4	4,4	
30				PS_5% FC30FD3	221,6	9,4	4,2	
40				PS_5% FC40FD3	187,2	7,7	4,1	
50				PS_5% FC50FD3	165,2	17,3	10,5	

O estudo da variação das condições de produção de microesferas de PS é reportado na Tabela 11 e Figura 17 onde é possível observar que quanto maior for a velocidade da fase contínua, para a mesma percentagem de polímero na FD, o tamanho das microesferas diminui. Pelas mesmas razões apresentadas para a utilização das microesferas de PCL com diâmetro aproximadamente de 250 μm , no caso do poliestireno as microesferas utilizadas foram as de diâmetro médio 261,48 μm correspondentes a uma fase contínua com caudal de 20 ml/h e uma fase descontínua com caudal de 3 ml/h.

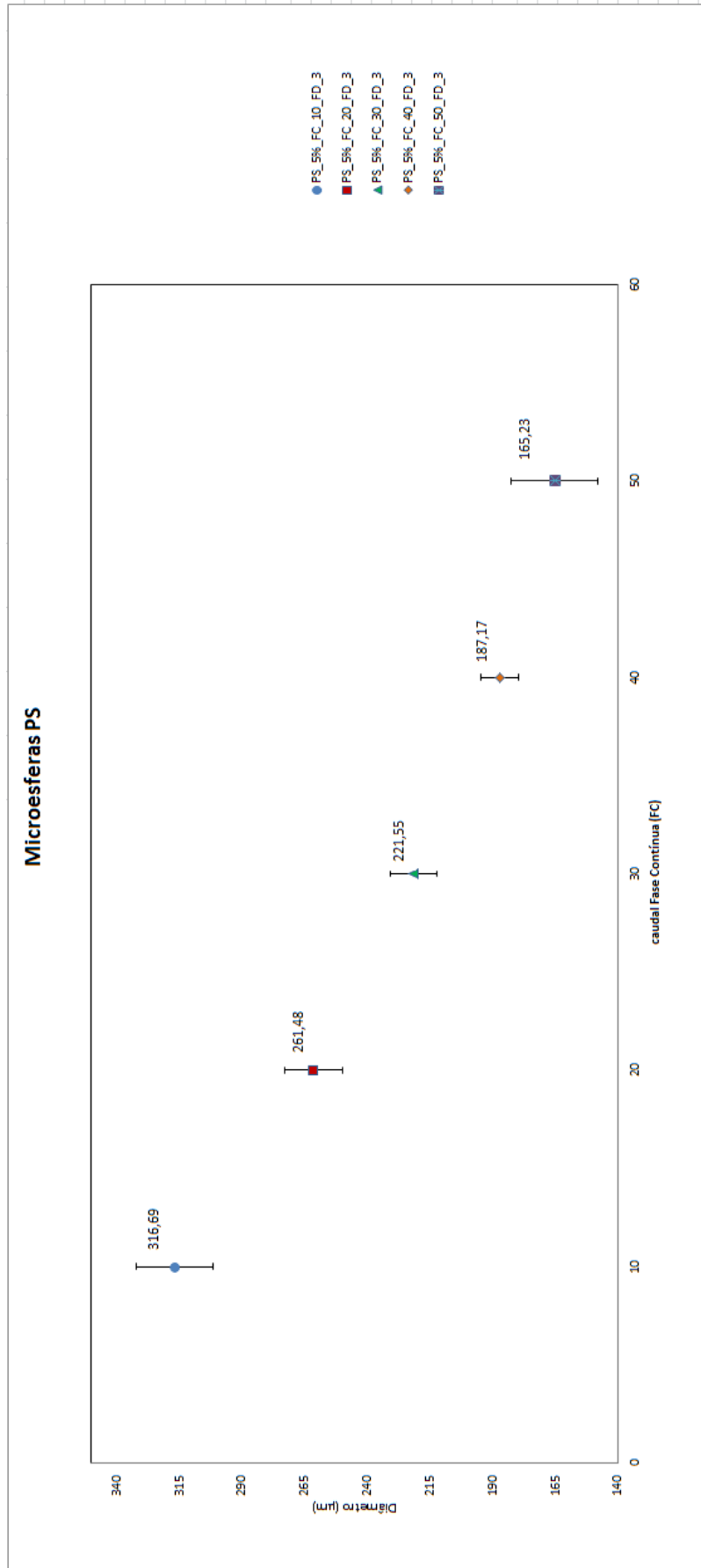


Figura 17 - Gráfico do estudo da variação das condições de produção de microesferas de PS (FC- fase contínua; FD – fase descontínua).

As microesferas de poliestireno com diâmetro médio de 261,48 μm foram observadas em SEM (Figura 18). É de notar que a medição dos diâmetros das microesferas é realizado com o auxílio do microscópio ótico enquanto as microesferas se encontram em suspensão. Na Figura 18 é observável uma redução de 1/5 dos diâmetros medidos inicialmente. Em relação às microesferas de PCL (Figura 14) as de poliestireno apresentam menos rugosidade e menos defeitos à superfície.

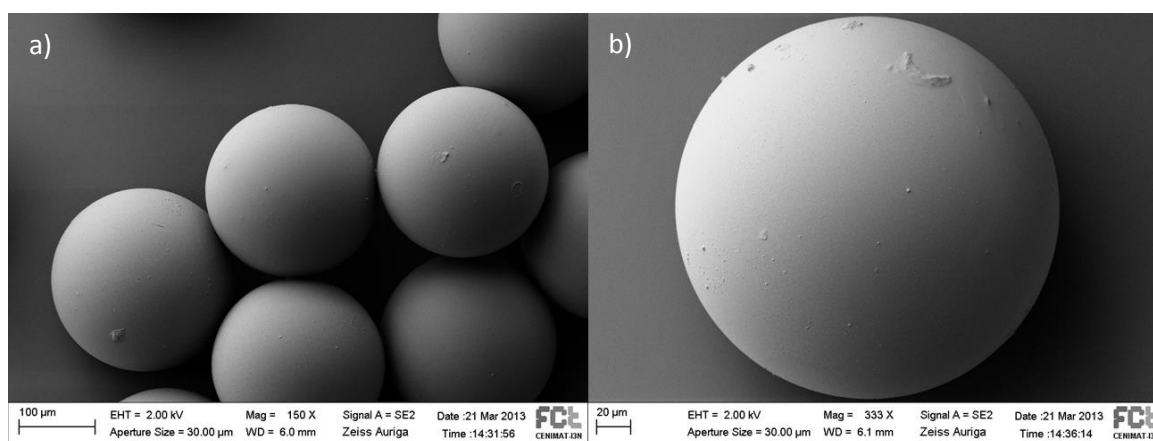


Figura 18 - Observação em SEM de microesferas de PS: a) Ampliação de 150x para observação da uniformidade dos tamanhos; b) Ampliação de 314x para observação da superfície das microesferas.

O poliestireno (PS) usado foi analisado por DSC para, à semelhança do PCL, determinar a temperatura de *annealing*. O termograma de DSC do PS é apresentado na Figura 19. Verificou-se a existência de uma transição vítrea a $T_g = 91,5^\circ\text{C}$, acima da qual as cadeias adquirem mobilidade e o polímero torna-se “moldável”. Para uma temperatura de aproximadamente 350°C ocorre uma perda de massa significativa resultado da degradação do poliestireno. A inexistência de um processo de fusão acima de T_g é consequência do carácter amorfo do PS. Assim, existe um intervalo de $91,5^\circ\text{C} - 350^\circ\text{C}$ que permite o manuseamento do polímero para a produção do CC; sendo que quanto maior a temperatura de *annealing* maior a difusão do material nas microesferas.

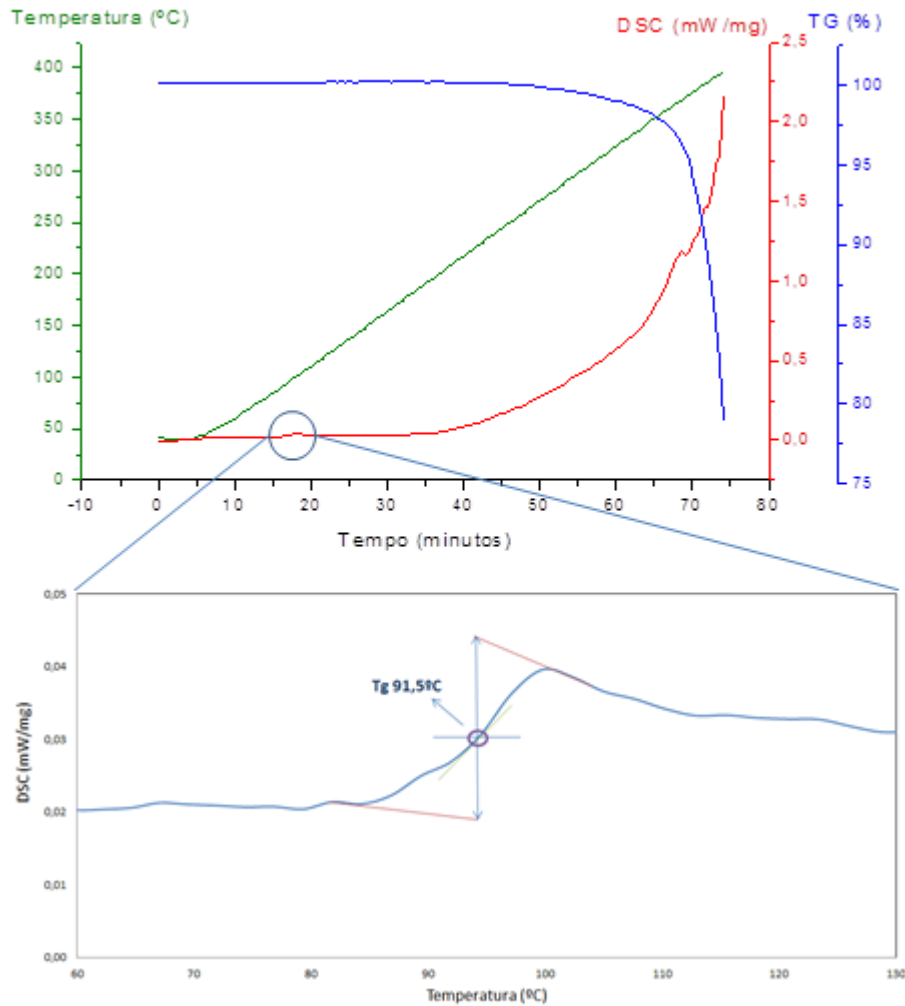


Figura 19 - Termograma de DSC do PS. O gráfico inferior consiste numa ampliação da zona do termograma (gráfico superior) assinalada com o círculo a azul.

III.2. Produção dos CCs

Com o intuito de observar a variação do empacotamento das microesferas com a alteração da temperatura, foram testadas duas temperaturas de *annealing*, nomeadamente 125°C e 135°C, superiores à temperatura de transição vítrea ($T_g = 91,5^\circ\text{C}$). Usaram-se temperaturas suficientemente acima de T_g de forma a garantir boa mobilidade das cadeias poliméricas, e que ao mesmo tempo não fossem muito elevadas provocando a difusão exagerada do material dando origem a um filme polimérico.

Na Figura 20 é possível observar a existência de empacotamento hexagonal compacto de microesferas de poliestireno, para uma temperatura de *annealing* de 125°C. A estrutura apresenta um empacotamento homogéneo, com alguns defeitos devido sobretudo à dispersão de diâmetros na produção das microesferas de poliestireno.

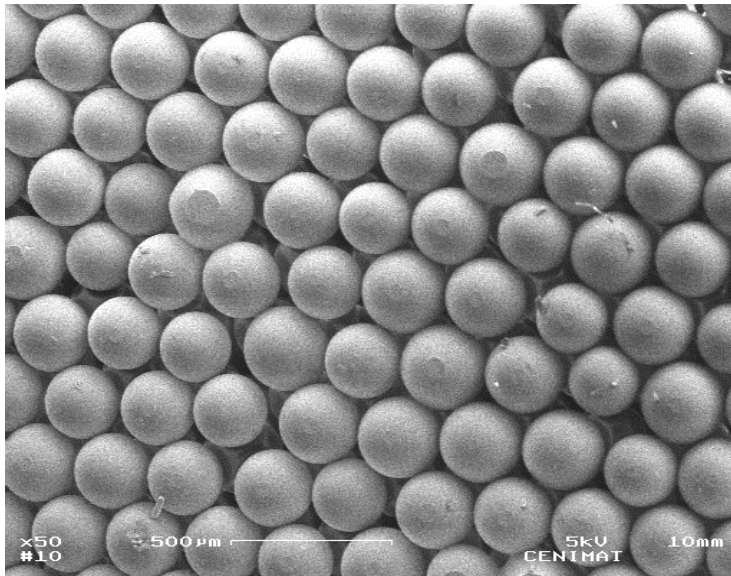


Figura 20 - Empacotamento hexagonal compacto das esferas de PS para uma temperatura de *annealing* de 125°C.

Em seguida foi avaliado o comportamento das microesferas para um empacotamento a uma temperatura de 135°C (Figura 21). É observada uma difusão heterogênea do polímero observando-se zonas onde esta é excessiva, dando origem a filmes.



Figura 21 - Empacotamento hexagonal compacto das esferas de PS para uma temperatura de *annealing* de 135°C.

Como tal, para continuação do trabalho experimental, nomeadamente produção dos ICCs, foi seleccionado o empacotamento de microesferas obtido com uma temperatura de *annealing* de 125°C, visto garantir homogeneidade da estrutura e, conseqüentemente, das pontes entre microesferas consecutivas que possuem diâmetro com dimensões suficientes (aproximadamente $\frac{1}{4}$ do diâmetro da microesfera) para garantir interconectividade dos poros e infiltração das células.

III.3. Caracterização dos Nanocristais de Hidroxiapatite

Os bastonetes de hidroxiapatite são produzidos através de uma síntese química da hidroxiapatite comercial. Após obtenção dos bastonetes, estes são suspensos em metanol 10% m/V e observados em SEM (Figura 22). Na figura 22.a) é notória a formação de um filme de bastonetes cujo comprimento está na ordem dos 200 nm e o diâmetro nos 20 nm (Figura 22 b)).

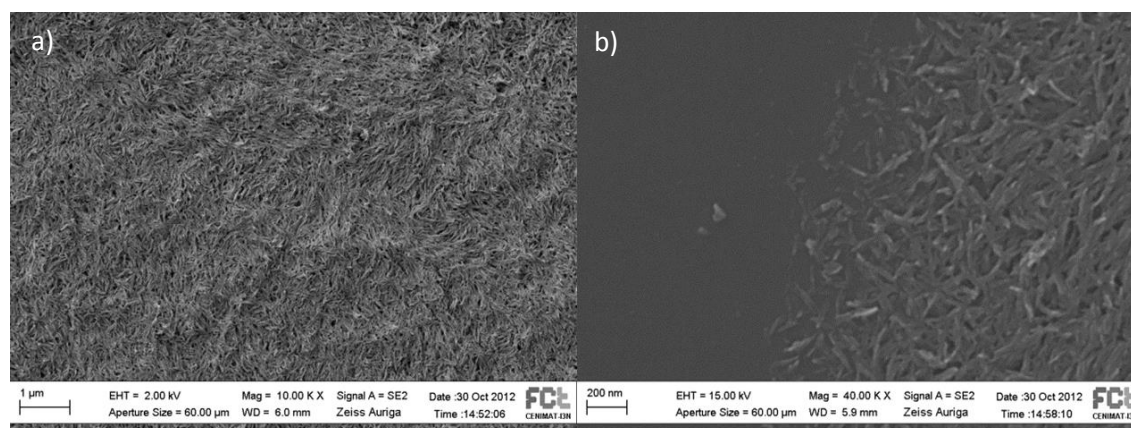


Figura 22 - Bastonetes de hidroxiapatite observados em SEM: a) Ampliação de 10000X; b) Ampliação de 40000X. O comprimento dos bastonetes é aproximadamente 200 nm.

Posteriormente procedeu-se à caracterização química da amostra, através da análise de FTIR (Figura 23). Os picos no espectro de FTIR das duas amostras são praticamente idênticos, o que mostra que o tratamento feito à HA, para produzir os bastonetes, não altera a composição química da mesma. Tratando-se de um tratamento físico, destinado a diminuir o tamanho de partícula, este resultado era o esperado. Os picos a 563 cm^{-1} , 601 cm^{-1} , 948 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} correspondem aos modos vibracionais da ligação P-O, do grupo fosfato (PO_4^{3-}) e o pico a 862 cm^{-1} à vibração simétrica de P-O(H) [98].

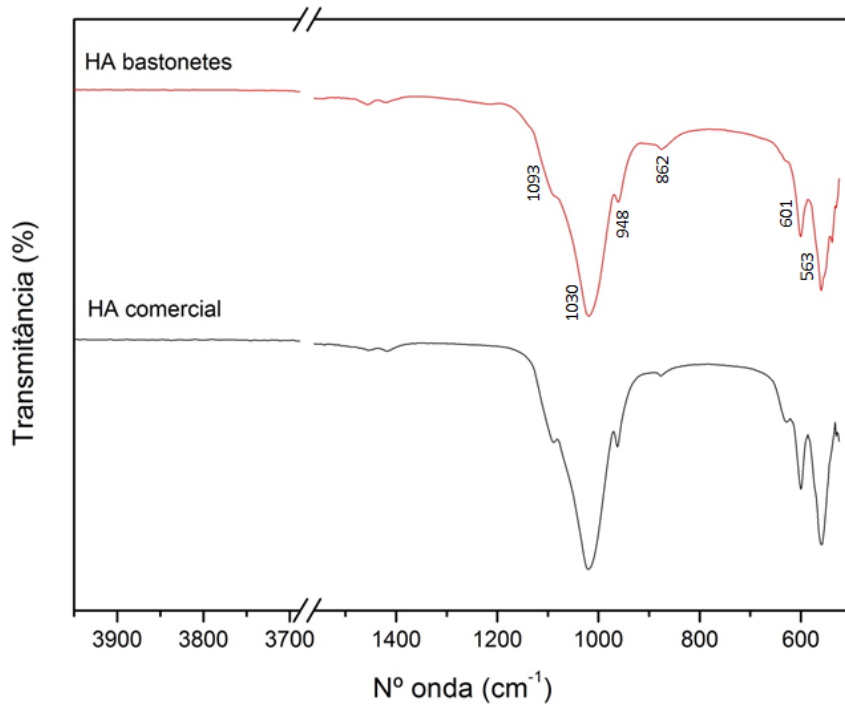


Figura 23 - Espectro de ATR-FTIR de hidroxiapatite comercial e dos bastonetes de HA.

Foram também efetuados estudos de DRX para complementar/corroborar os dados de FTIR. A Figura 24 apresenta uma comparação de um espectro de DRX da HA comercial, hidroxiapatite de partida, com os bastonetes de hidroxiapatite produzidos.

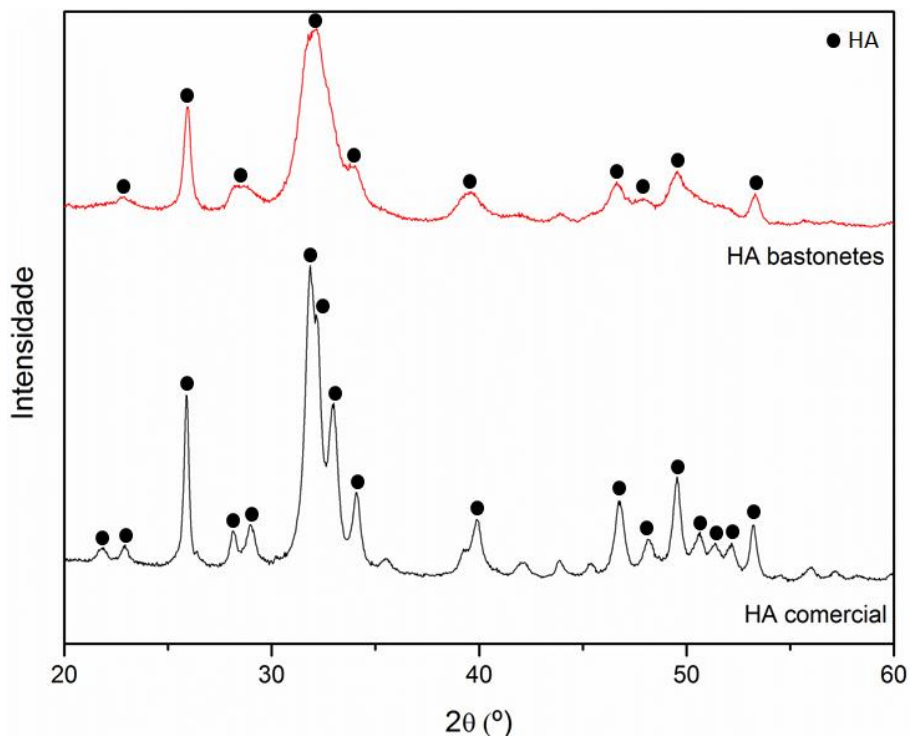


Figura 24 - Difratomogramas da hidroxiapatite de partida (comercial) e dos bastonetes produzidos.

Nos dois difratogramas são observados exclusivamente picos característicos da hidroxiapatite. Tal como referido anteriormente, a produção dos bastonetes de HA é um processo físico, pelo que não seria de esperar outro resultado. Outros fosfatos de cálcio e, eventualmente, outros produtos (como o CaO), só podem resultar da decomposição térmica da HA que, obviamente, não poderia ocorrer neste caso. A diferença entre a intensidade dos picos da hidroxiapatite de partida e os bastonetes de hidroxiapatite prende-se com o facto de que na presença de estruturas nanocristalinas os picos de DRX diminuem de intensidade e a largura a meia altura aumenta [98], tal como se confirma pelo cálculo do tamanho de cristalite feito a partir da fórmula de Scherrer [99]:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Onde D é o tamanho da cristalite, K o factor de forma (normalmente 0,9), λ é o comprimento de onda dos raios-X, β é a largura a meia altura do pico de intensidade máxima e θ o ângulo de Bragg correspondente. Assim:

$$D_{\text{HA comercial}} = \frac{0,9 \cdot 1,54059}{0,01808 \cdot \cos(0,27775)} = 80 \text{ nm}$$

$$D_{\text{HA nanocristais}} = \frac{0,9 \cdot 1,54059}{0,03325 \cdot \cos(0,28096)} = 43 \text{ nm}$$

A diminuição de tamanho de cristalite é reveladora de uma diminuição de cristalinidade da HA, após o tratamento físico usado na produção dos bastonetes.

III.4. Obtenção dos ICCs

Após produção dos CCs, e definida a temperatura de *annealing* (125°C), procurou-se estudar a influência da adição de hidroxiapatite na morfologia do ICC. Na Figura 25 é possível observar as alterações no espectro de EDS com a variação das frações volúmicas de quitosano e de hidroxiapatite. Em todos os espectros da Figura 25 é observado um pico de ouro (Au) por volta dos 2keV resultado do revestimento das amostras. Na Figura 25 a) está presente o espectro do ICC 100% polimérico, e como consequência surgem dois picos, dos átomos carbono e oxigénio, presentes na cadeia polimérica. Com a introdução (Figura 25 b)) e aumento da fração volúmica de hidroxiapatite (Figura 25 c) e d)) surgem os picos de cálcio e fósforo, característicos do cerâmico, que aumentam de intensidade com o aumento de hidroxiapatite presente.

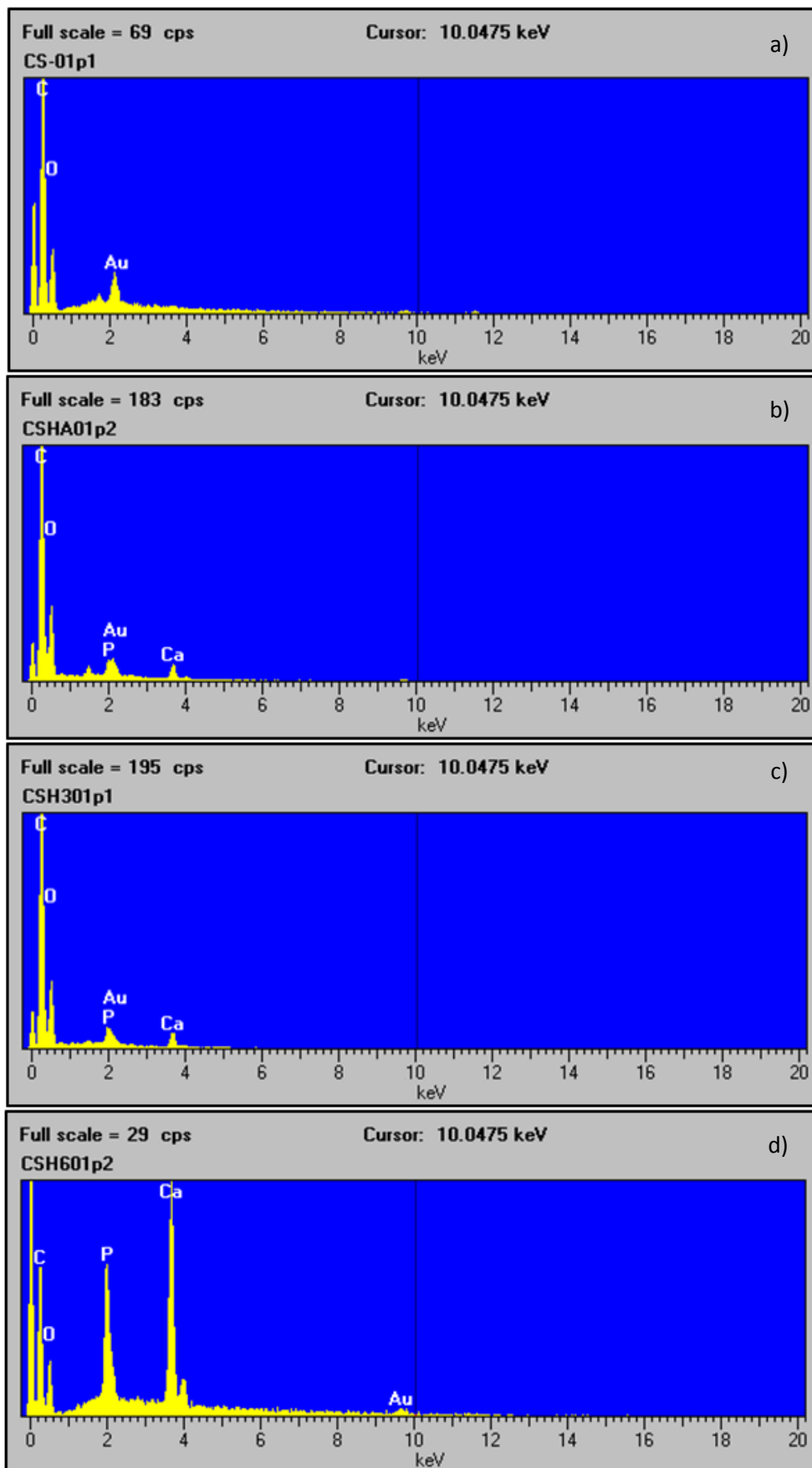


Figura 25 – Espetro de EDS das paredes dos ICCs: a) $\Phi_C = 1,00$ e $\Phi_{HA} = 0,00$; b) $\Phi_C = 0,86$ e $\Phi_{HA} = 0,14$; c) $\Phi_C = 0,67$ e $\Phi_{HA} = 0,33$; d) $\Phi_C = \Phi_{HA} = 0,50$.

Em seguida os ICCs foram observados em SEM (Figura 26). É de notar a presença de paredes porosas (Figura 26 a)), resultado da liofilização do polímero quitosano. Com a introdução de hidroxiapatite, Figura 26 b), c) e d), as paredes tornam-se cada vez mais finas e menos porosas consequência da sua densificação devido à presença do cerâmico.

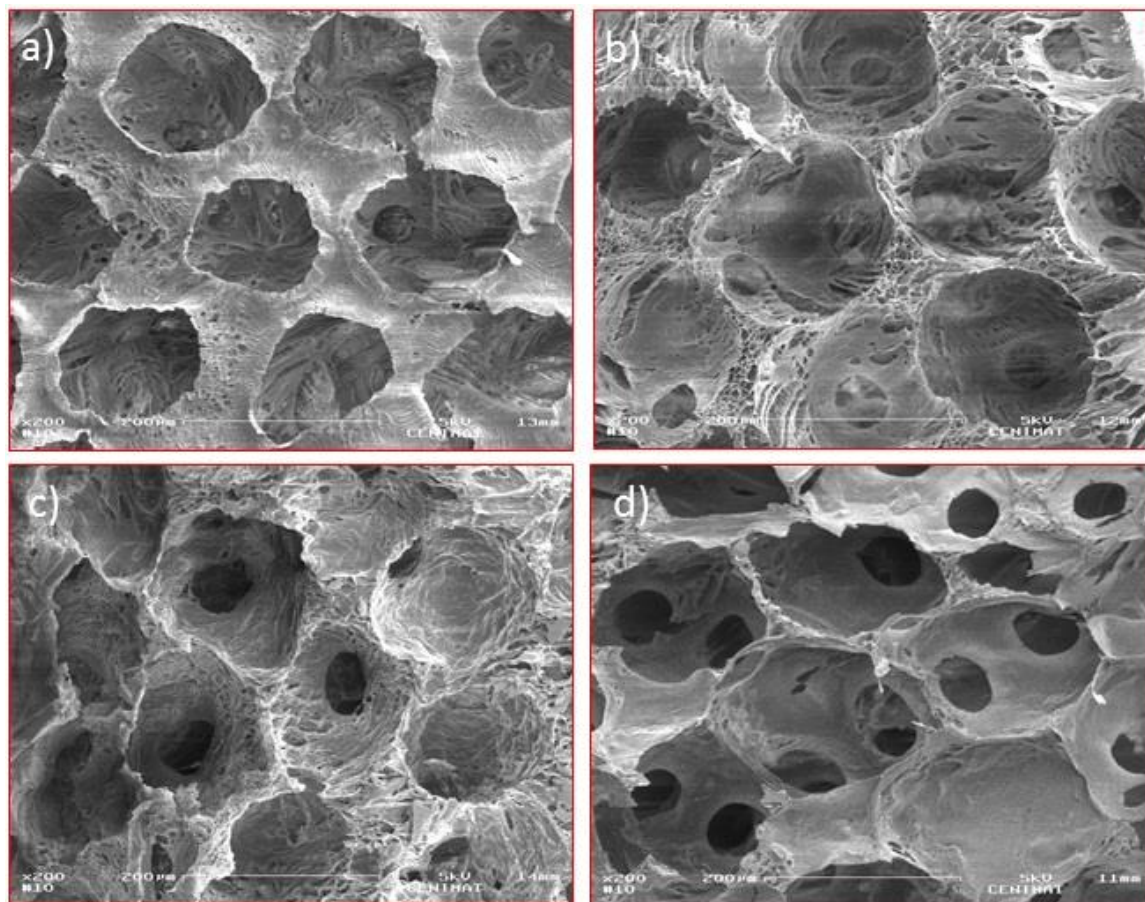


Figura 26 - Imagens SEM dos ICCs com 200x de ampliação: a) $\Phi_{Cs} = 1,00$ e $\Phi_{HA} = 0,00$; b) $\Phi_{Cs} = 0,86$ e $\Phi_{HA} = 0,14$; c) $\Phi_{Cs} = 0,67$ e $\Phi_{HA} = 0,33$; d) $\Phi_{Cs} = \Phi_{HA} = 0,50$.

Para confirmar a influência da densificação das paredes do ICC por parte dos nanocristais de hidroxiapatite, calcularam-se as porosidades correspondentes a cada ICC (Tabela 12), através da expressão [100]:

$$\text{Porosidade (\%)} = 1 - \frac{\rho_{ICC}}{\rho_0}$$

Tabela 12 - Porosidades associadas a cada ICC.

Fração volúmica		ρ/ρ_0	Porosidade (%)
Cs	HA		
1,00	0,00	0,100	98,7%
0,86	0,14	0,215	98,4%
0,67	0,33	0,237	98,5%
0,50	0,50	0,258	98,6%

Todos os ICCs possuem porosidade superior a 74% o que seria de esperar, visto a porosidade resultante da réplica do empacotamento cúbico de faces centradas ser de 74%⁶ [101].

III.5. Citotoxicidade

As células Saos-2 utilizadas para testar a citotoxicidade dos ICCs são deixadas a incubar durante 24 horas para posterior medição da absorvância das soluções. Como já referido anteriormente é utilizado o reagente PrestoBlue™ que é metabolizado pelas células viáveis e transformado num composto (a resorufina) que possui um espectro de absorção desviado para o azul e é fluorescente. Na Figura 27 é possível observar a mudança de cor do meio; nos poços em que o meio esteve em contacto com os diferentes materiais e no controlo C. a solução apresenta um tom mais lilás resultado da atividade metabólica das células viáveis presentes nos poços que transformam a resazurina em resorufina.

Quanto aos controlos C₊ e C_M, não há qualquer alteração da cor que resulta numa solução azulada, a cor do reagente PrestoBlue™. Este resultado é expectável na medida em que no controlo C₊ houve uma adição de DMSO (Dimetilsulfóxido, > 99,9%, MERCK) ao meio o que provocou morte celular, e no controlo do meio C_M não foi semeado qualquer tipo de células.

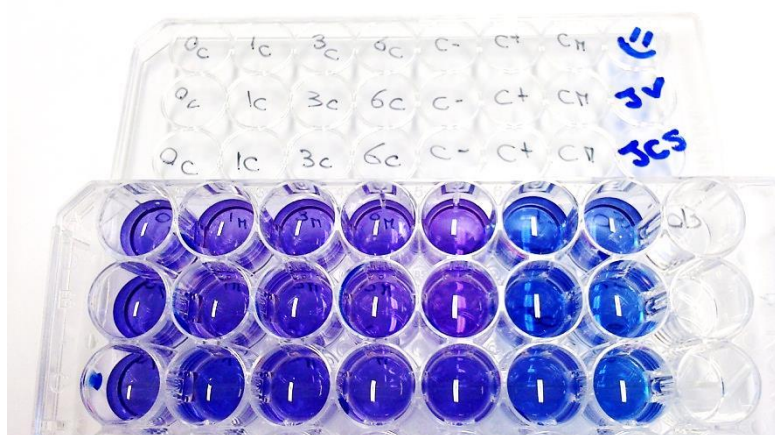


Figura 27 - Resultados obtidos nos testes de citotoxicidade utilizando como indicador o reagente PrestoBlue™. Os poços que apresentam uma cor lilás indicam presença de atividade metabólica e consequentemente a presença de células viáveis.

⁶ Num empacotamento cúbico de faces centradas (ou hexagonal compacto) 74% do volume é ocupado por esferas. Na réplica invertida deste empacotamento as esferas dão origem a poros, pelo que a porosidade será de 74%. Este valor poderá ser consideravelmente superior, se as paredes das células geradas forem também porosas.

Para confirmar a viabilidade celular dos meios que estiveram em contacto com os ICCs relativamente ao CM procedeu-se a uma leitura de absorvância de cada amostra. Os resultados apresentados na Tabela 13 exibem uma viabilidade celular superior a 80% para os meios que tiveram previamente em contacto com os materiais (ICCs).

Tabela 13- Resultados das medições de absorvância no teste de citotoxicidade, utilizando como indicador o reagente PrestoBlue™. A viabilidade celular para todas as amostras é superior a 80%. A, B e C correspondem aos três ICCs produzidos para cada fração volúmica, $\bar{x}_{amostra}$ corresponde à média das amostras A,B e C e $\bar{\sigma}_{amostra}$ ao respetivo desvio padrão.

Φ Quitosano	1,00	0,86	0,67	0,50	Controlos		
Φ Hidroxiapatite	0,00	0,14	0,33	0,50	C-	C+	CM
A	0,193	0,186	0,179	0,175	0,218	0,005	-0,056
B	0,197	0,193	0,176	0,176	0,227	0,007	-0,084
C	0,168	0,158	0,185	0,158	0,175	0,063	0,141
$\bar{x}_{amostra}$	0,186	0,179	0,180	0,169	0,207	0,006	-0,070
$\bar{\sigma}_{amostra}$	0,013	0,015	0,004	0,008	0,023	0,001	0,014
Viabilidade celular relativa							
$\frac{\bar{x}_{amostra}}{\bar{x}_{C-}} (\%)$	90%	86%	87%	82%	100%	3%	—

É possível afirmar que para qualquer amostra os materiais não apresentam natureza citotóxica. Esta conclusão resulta do facto do meio de cultura que esteve previamente em contacto com os ICC não apresentar qualquer carácter citotóxico quando colocado em contacto com as células animais.

III.6. Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos ICCs e dos liofilizados que constituem as paredes destes foram obtidas através de testes de compressão e respetiva análise. Como resultado dos testes de compressão surge uma curva de Tensão/Extensão com três zonas distintas (Figura 28). Na região A verifica-se uma região linear cujo declive da reta diz respeito ao módulo de Young E, ou seja, o módulo de compressão inicial a que está sujeito o material. Numa segunda região, região B, está presente uma zona de patamar que corresponde à região de cedência do material. A tensão de colapso, σ^* , é determinada pela interseção das tangentes à curva nas duas zonas, elástica e de patamar. Por fim na região C ocorre a densificação do material, onde as paredes do ICC colapsam promovendo uma diminuição da porosidade. A extensão máxima, ε_d , corresponde a uma densificação total (porosidade = 0 %) da estrutura.

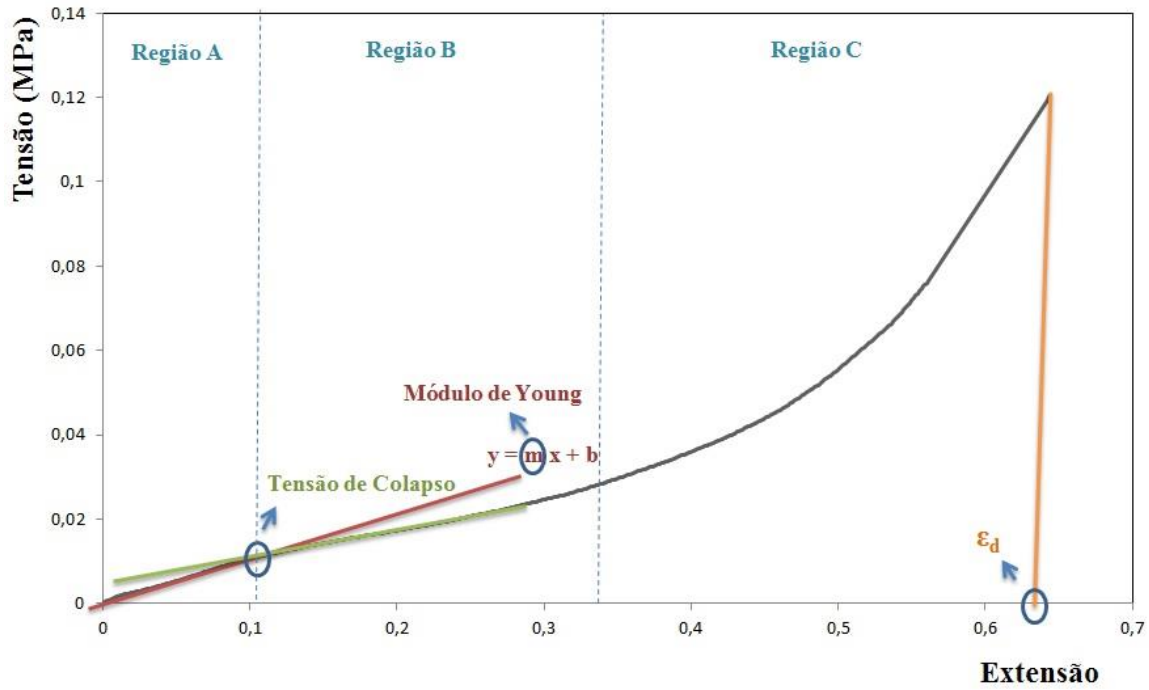


Figura 28 - Curva de compressão típica de um ICC com frações volúmicas $\Phi_{Cs} = 0,86$ e $\Phi_{HA} = 0,14$. Os liofilizados apresentam curvas de compressão qualitativamente semelhantes.

Nas Figura 29 e 30 apresentam-se as curvas de compressão dos materiais estudados, em função da fração volúmica de hidroxiapatite. Quer os liofilizados quer os ICCs apresentam, qualitativamente, este comportamento. Verifica-se a diminuição do patamar, à medida que se adiciona hidroxiapatite. Este facto é típico de espumas porosas 3D, e está relacionado com a diminuição da porosidade da estrutura [102].

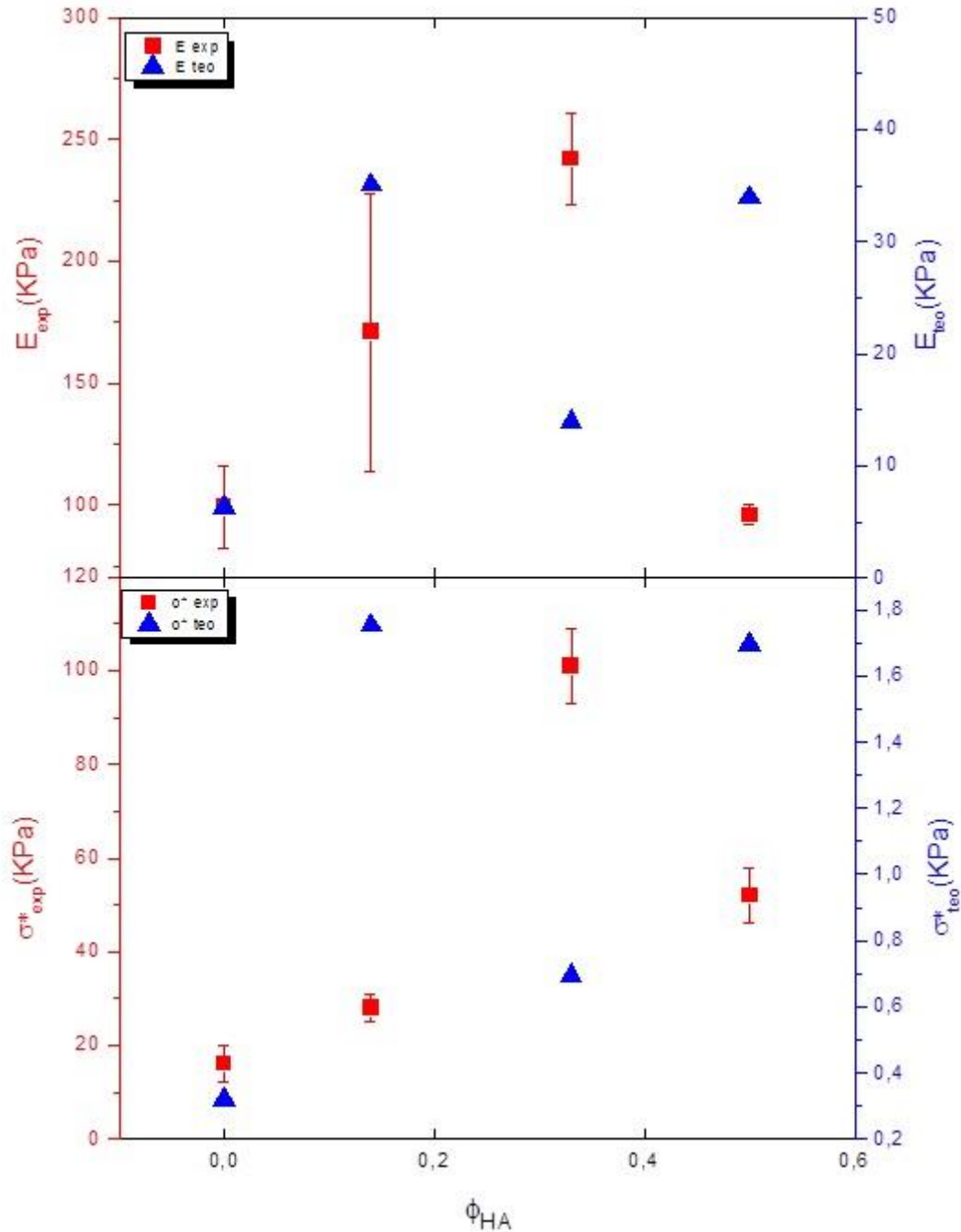


Figura 29 - Variação dos parâmetros mecânicos dos ICC, com a fração volúmica de HA. O gráfico superior apresenta o módulo de Young teórico (teo) a azul e o experimental (exp) a vermelho dos ICCs para diferentes frações volúmicas de hidroxiapatite. O gráfico inferior apresenta a tensão de colapso teórica (azul) e experimental (vermelho) em função de Φ_{HA} .

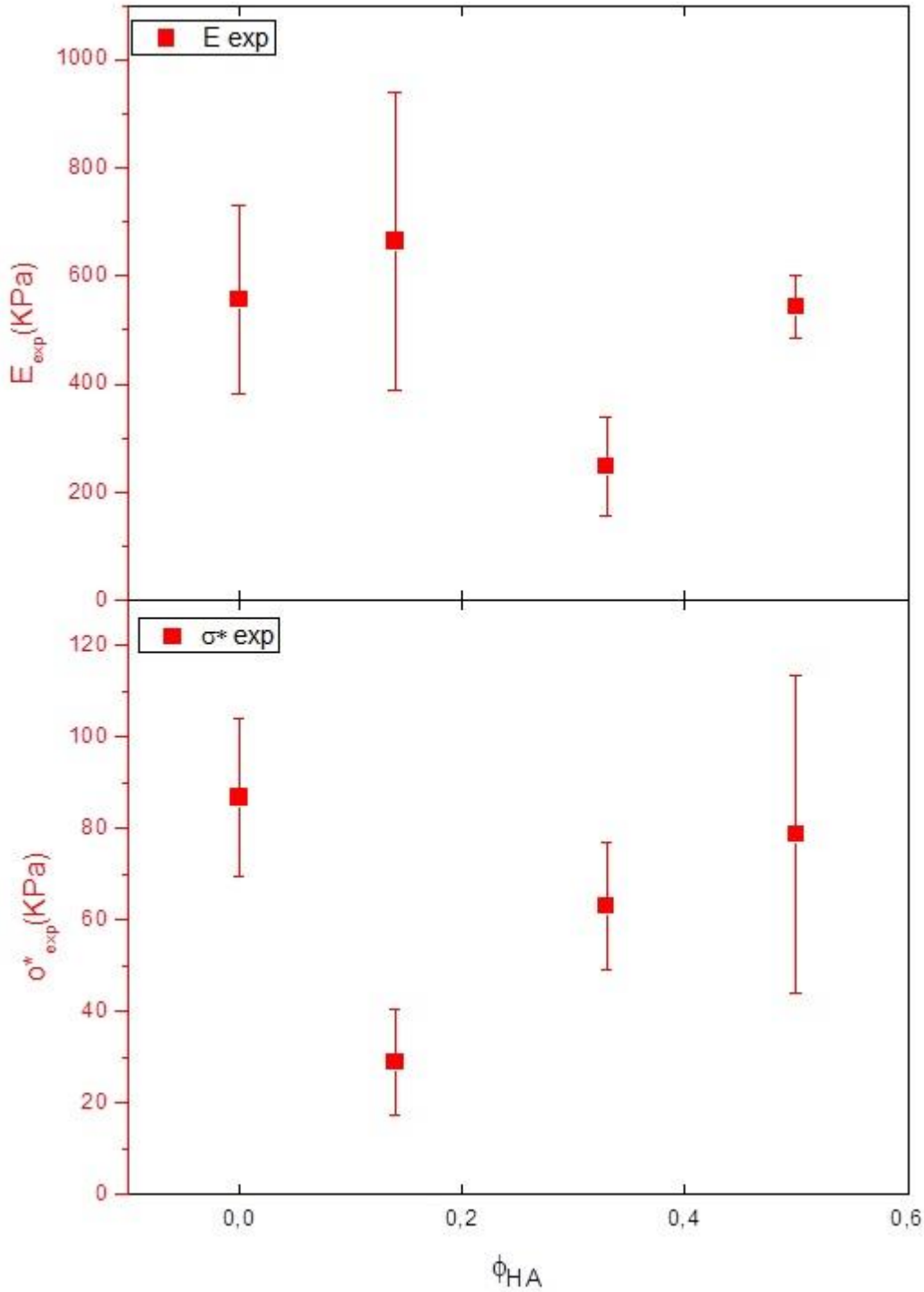


Figura 30 - Variação dos parâmetros mecânicos dos liofilizados, com a fração volúmica de HA. O gráfico superior apresenta o módulo de Young experimental (exp) dos liofilizados para diferentes frações volúmicas de hidroxiapatite. O gráfico inferior apresenta a tensão de colapso experimental dos liofilizados em função de Φ_{HA} .

Nas Figura 29 e 30 e na Tabela 14 (Anexo C) é possível verificar que não existe qualquer relação entre o módulo de Young e a tensão de colapso, dos ICCs e dos liofilizados, e a variação da fração volúmica de HA. Seria de esperar uma melhoria nas propriedades mecânicas, nomeadamente um aumento significativo do módulo de Young com a adição de hidroxiapatite [103].

Em parte, o uso de uma amostra estatisticamente pequena pode ser justificativo deste facto, contudo não será o fator mais importante. Nos liofilizados, a aleatoriedade dos resultados poderá também estar relacionada com a má dispersão dos bastonetes de hidroxiapatite. Estes bastonetes, como qualquer material com dimensão à nanoescala, têm tendência a agregar. Estes agregados serão responsáveis pela falta de homogeneidade dos materiais e pelos resultados obtidos. A dispersão dos bastonetes de hidroxiapatite deverá ser objeto de estudo futuro, para que as propriedades mecânicas possam ser otimizadas. Obviamente, as propriedades mecânicas dos ICCs também serão afetadas por este facto.

Por outro lado, no que respeita aos ICCs, a impregnação dos CCs pode estar também na origem da aleatoriedade dos resultados obtidos. Devido à crescente viscosidade da solução de impregnação, aquando do aumento da fração volúmica de hidroxiapatite, o tempo de impregnação aumenta. Tal observação é reveladora de uma dificuldade crescente em impregnar os CCs e que poderá estar na origem da diminuição da espessura da parede dos ICCs (ver Figura 26). A espessura da parede está associada à quantidade de material que irá ocupar os interstícios deixados pelas microesferas e que deverá ser tanto menor quanto maior a viscosidade da solução usada na impregnação.

A lixiviação das microesferas com diclorometano no processo de formação do ICC poderá também estar na origem dos resultados mecânicos inesperados. A solução utilizada no processo de lavagem é reutilizada diversas vezes o que pode provocar uma saturação de poliestireno na solução de lavagem de diclorometano. Como tal, o poliestireno não é totalmente retirado do ICC o que resulta em materiais em que os poros não estão totalmente interconectados, tal como os que se encontram na Figura 26.

Com vista a contornar estes problemas na estrutura dos ICCs um novo ICC foi produzido. Para facilitar o processo de impregnação, utilizou-se uma temperatura de *annealing* mais baixa, que resulta numa menor união entre microesferas vizinhas e num maior espaço intersticial para ser ocupado pela solução de impregnação.

A temperatura de *annealing* utilizada foi de 115°C, que permitiu obter um empacotamento mais homogêneo (Figura 31). Os pequenos defeitos observados devem-se à dispersão dos diâmetros das microesferas (dispersão na ordem dos 5%).

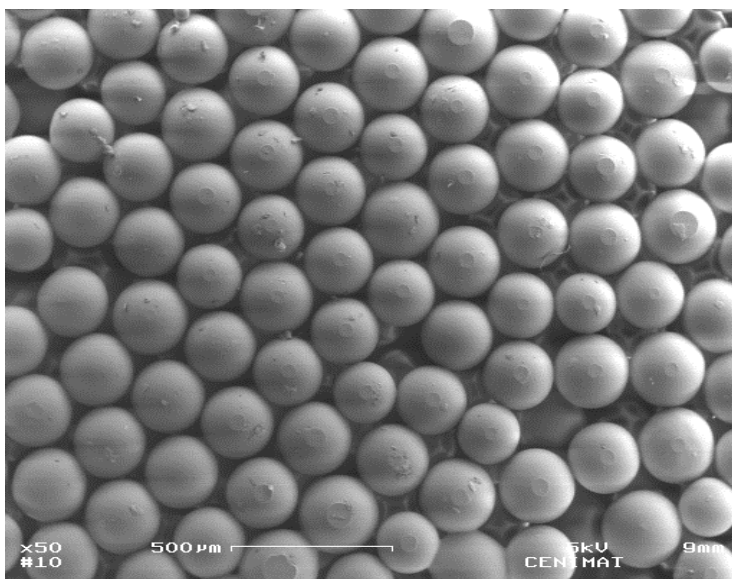


Figura 31 - Empacotamento hexagonal compacto das esferas de PS para uma temperatura de *annealing* de 115°C.

Foi produzido um ICC 100% polimérico, utilizando o CC da Figura 31, em que as lavagens foram realizadas recorrendo a novas soluções de diclorometano e etanol. Na Figura 32 observa-se em SEM uma estrutura com poros totalmente definidos e totalmente interconectados, que não acontece na melhor estrutura apresentada na Figura 26.

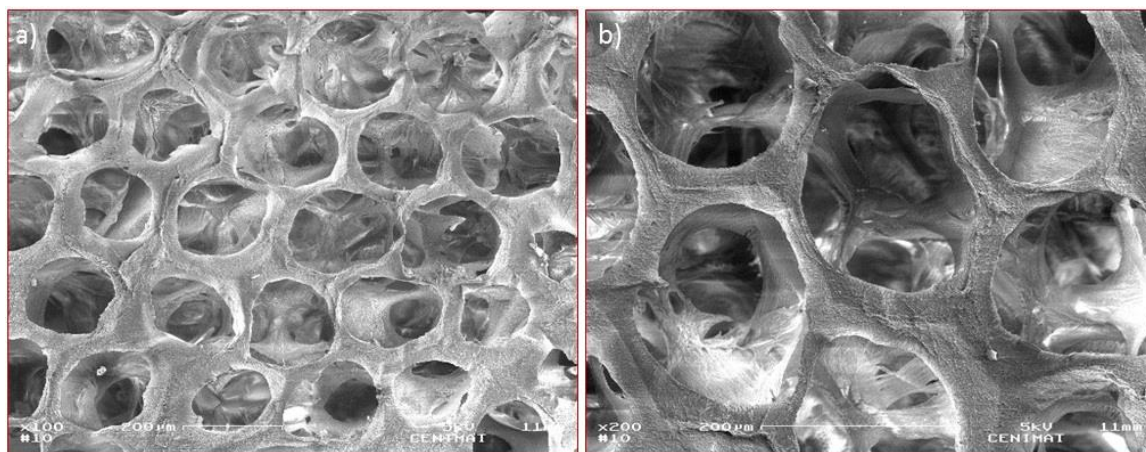


Figura 32 – Imagens de SEM de um ICC 100% polimérico correspondendo a uma temperatura de *annealing* de 115°: a) Ampliação 100x; b) Ampliação 200x.

Esta estrutura é mais homogênea o que implica uma melhoria nas propriedades mecânicas do ICC. Deste modo confirma-se a necessidade de melhoria no processo de retirada das microesferas de poliestireno, e na diminuição da temperatura de *annealing* para uma temperatura mais baixa que permita uma melhor e mais homogênea impregnação do CC.

No gráfico da Figura 29 é também possível observar que não existe concordância entre os valores do módulo de Young e da tensão de colapso obtidos experimentalmente, para os ICCs, e os previstos a partir do modelo de Gibson e Ashby [102]. Este modelo permite prever, com um elevado grau de confiança, as propriedades de espumas 3D porosas com porosidades superiores a 70%. Sendo os ICCs estruturas quase ideais este resultado só pode ser explicado pelo que atrás foi referido.

IV. Conclusões e Perspetivas Futuras

Nesta dissertação foram produzidos e caracterizados ICCs para aplicação no campo da Engenharia de Tecidos, mais concretamente em substituição óssea.

Inicialmente, foram produzidas microesferas de policaprolactona e de poliestireno com diâmetro de aproximadamente 250 μm . O carácter semicristalino do PCL impediu o controlo do processo de *annealing*. Verificou-se que uma ligeira diminuição da temperatura (abaixo da temperatura de fusão do PCL, T_f) impedia o empacotamento de microesferas vizinhas e por outro lado, um ligeiro aumento da temperatura (acima de T_f) promovia a formação de um filme polimérico. Como tal, para a fabricação do CC foram utilizadas apenas as microesferas de poliestireno.

Posteriormente foram testadas duas temperaturas de *annealing*, nomeadamente 125°C e 135°C. Estas temperaturas foram escolhidas em função da temperatura de transição vítrea do poliestireno. À temperatura de 125°C a difusão do material foi homogénea em todo o CC, enquanto que para uma temperatura de 135°C o empacotamento não é homogéneo apresentando regiões onde não existia qualquer ligação entre microesferas vizinhas, e outras regiões onde ocorreu a difusão completa do material, dando origem a um filme polimérico.

Foram produzidos os ICCs, através de um processo de remoção das microesferas de poliestireno, com o seu espaço intersticial a ser preenchido por soluções com frações volúmicas crescentes de hidroxiapatite ($\phi_{\text{Cs}} = 1,00$; $\phi_{\text{Cs}} = 0,86$ e $\phi_{\text{HA}} = 0,14$; $\phi_{\text{Cs}} = 0,67$ e $\phi_{\text{HA}} = 0,33$; $\phi_{\text{Cs}} = \phi_{\text{HA}} = 0,50$). Com o objetivo de reproduzir os nanocristais de HA presentes no osso, a hidroxiapatite utilizada neste trabalho foi produzida através de um tratamento físico à hidroxiapatite comercial, dando origem a bastonetes com comprimento de aproximadamente 200 nm.

Os ICCs produzidos foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas, por ensaios de compressão. Verificou-se que não existe qualquer relação entre as propriedades mecânicas dos ICCs e a fração volúmica de HA. Este resultado deveu-se, em parte, à má lixiviação das microesferas de poliestireno no processo de produção do ICC.

Outro fator que pode ter contribuído para os resultados dos testes de compressão foi a temperatura de *annealing* das microesferas. Quanto maior a temperatura de *annealing*, maior o ponto de contacto entre microesferas e, conseqüentemente, menor o espaço intersticial das mesmas, o que torna mais difícil o processo de impregnação.

Para confirmar se a temperatura de *annealing* e a lixiviação das microesferas, representavam problemas significativos na estrutura, um novo ICC foi produzido. Foi utilizada uma temperatura

de *annealing* a 115°C e um processo de lixiviação com novas soluções. Como resultado o ICC apresentou-se com uma estrutura mais homogénea, com todos os poros interconectados.

Por outro lado, foram efetuados ensaios de compressão ao material constituinte das paredes do ICC. Mais uma vez os resultados não foram concordantes com a bibliografia, o que indica que as soluções de impregnação também influenciaram a variação das propriedades mecânicas dos ICCs. Um dos problemas apontados para a aleatoriedade dos resultados é a má dispersão dos nanocristais de HA. A agregação dos nanocristais na solução de impregnação, faz com que a solução constituinte das paredes deixe de ser homogénea.

Como o objetivo fundamental deste trabalho consistiu em produzir ICCs para substituição óssea, o carácter citotóxico dos ICCs foi avaliado. Quando em contacto com meio biológico, os ICC não revelaram carácter citotóxico, e a viabilidade celular foi superior a 80%.

Este trabalho representa um estudo inicial no processo de obtenção dos ICCs ideais para aplicações em Engenharia de Tecidos e existe a necessidade de aprofundar e melhorar alguns aspetos, nomeadamente as propriedades mecânicas do material, considerando algumas possíveis soluções:

- ✓ Numa última etapa do trabalho, a temperatura de *annealing* para formação do CC foi diminuída, o que revelou uma maior homogeneidade da impregnação e uma melhoria significativa da porosidade. Como tal deveria ser realizado um estudo de otimização da temperatura de *annealing* para as microesferas de poliestireno.
- ✓ Melhoria no processo de lixiviação das microesferas para formação do ICC. No processo de lavagem tem de ser garantida uma completa eliminação do poliestireno da estrutura do ICC, para não influenciar qualquer tipo de propriedades inerentes ao material.
- ✓ Adicionar surfactante/dispersante às soluções de impregnação para impedir a agregação dos nanocristais de hidroxiapatite. A introdução deste parâmetro promoveria a homogeneidade das soluções e consequentemente das paredes do ICC.

Bibliografia

- [1] "Fratura no colo do fêmur," Alpes Medical Technology, [Online]. Available: <http://alpesmedical.no.comunidades.net/index.php?pagina=1015936285>. [Acedido em 20 01 2013].
- [2] "Bone Graft Substitutes - Symposium," [Online]. Available: <http://www.hwbf.org/ota/am/ota03/bssf/OTA03BG1.htm>. [Acedido em 10 02 2013].
- [3] M. Puska, A. Aho and P. Vallittu, "Polymer Composites for Bone Reconstruction," in *Advances in Composite Materials - Analysis of Natural and Man-Made materials*, Intech, 2011, pp. 55-72.
- [4] "Pseudoartrose (Fraturas Não Consolidadas) um Retardo da Consolidação," [Online]. Available: http://www.sbtoc.org.br/html/indicacoes_oc3.htm. [Acedido em 11 02 2013].
- [5] Lohmann, "Economic impact of cancellous bone grafting in trauma surgery," *Arch OT Surg*, vol. 127, pp. 345-348, 2007.
- [6] "Complicações das fraturas," [Online]. Available: http://www.cultura.ufpa.br/ortraum/complicacoes_das_fraturas.htm. [Acedido em 20 01 2013].
- [7] Roschger and .. et al, "The complexity and heterogeneity of bone material," *MEDICOGRAPHIA, Vol 34, No. 2, 2012, Vols. 34, Nº2*, pp. 155-161, 2012.
- [8] S. v. Gaalen, M. Kruyt, G. Meijer, A. Mistry, A. Mikos, J. v. d. Beucken, J. Jansen, K. d. Groot, R. Cancedda, C. Olivo, M. Yaszemski and W. Dhert, "Tissue Engineering of Bone," in *Tissue Engineering*, Academic Press series in biomedical engineering, 2008, pp. 559-562.
- [9] "Geoscienceworld," [Online]. Available: <http://elements.geoscienceworld.org/content/4/2/97/F7.large.jpg>. [Acedido em 03 04 2013].
- [10] "Microscopic Structure of Compact Bone," [Online]. Available: <http://classconnection.s3.amazonaws.com/274/flashcards/1202274/png/microscopic-structure-of-compact-bone1329425371964.png>. [Acedido em 20 01 2013].
- [11] J. Young Rho, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone," *Medical Engineering & Physics*, vol. 20, p. 92-102, 1998.
- [12] M. Vallet-Regí and J. González-Calbet, "Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues," *Progress in Solid State Chemistry*, vol. 32, pp. 1-31, 2004.

- [13] M. Olszta and . et al., "Bone structure and formation: A new perspective," no. 1000 Osso . M.J. Olszta et al., Bone structure and formation A new perspective, (2007), 2007.
- [14] D. R. Eyre and J.-J. Wu, "Collagen Cross-Links," *Top Curr Chem*, vol. 247, pp. 207-229, 2005.
- [15] R. C Langer and J. Vacanti, "Tissue engineering," *Science*, vol. 260, pp. 920-927, 1993.
- [16] L. Xiaohua and P. X.MA, "Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Annals of Biomedical Engineering*, Vols. 32, N°3, pp. 477-486, 2004.
- [17] J. Fonseca, "Bone biology: from macrostructure to gene expression," *Medicographia*, vol. 34, pp. 142-148, 2013.
- [18] Y. S. A. X. Fangzhi Huang, "Study on synthesis and properties of hydroxyapatite nanorods and its complex containing biopolymer," *J Mater Sci*, vol. 42, p. 8599–8605, 2007.
- [19] M. L. H. F. a. X. Z. Huaifa Zhang, "Carbonated Nano Hydroxyapatite Crystal Growth Modulated by Poly(ethylene glycol) with Different Molecular Weights," *Cryst. Growth Des.*, vol. 12, pp. 2204-2212, 2012.
- [20] M. Vert, M. Li, G. Spenlehauer and P. Guerin, "Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters," *J Mater Sci*, vol. 3, pp. 432-446, 1992.
- [21] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen and J. E. Lemons, *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, 2ª Edição: Elsevier, 2004.
- [22] M. Vallet-Regit, "Evolution of bioceramics within the field of biomaterials," vol. 13, pp. 174-185, 2010.
- [23] C. Liu, Z. Xia and J. T. Czernuszka, "Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering," *ChemE*, vol. 85, pp. 1051-1064, 2007.
- [24] L. Griffith, "Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 961, pp. 83-95, 2002.
- [25] D. Hutmacher, T. Woodfield, P. Dalton and J. Lewis, *Tissue Engineering, Academic press series in biomedical engineering*, 2005, pp. 403-448.
- [26] D. M. Yunos, O. Bretcanu and A. R. Boccaccini, "Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds," *J Mater Sci*, vol. 43, pp. 4433-4442, 2008.
- [27] D. W. Hutmacher, Y. Mei and J. Burdick, "Materials under skin: From the lab to the clinic," *materialstoday*, Vols. 15, N°10, 2012.
- [28] J. Bonadio, E. Smiley, P. Patil and S. Goldstein, "Localized, direct plasmid gene delivery in vivo prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration," *Nat. Med.*, pp. 5753-

- 5759, 1999.
- [29] S. Choi, Y. Zhang and Y. Xia, "Three-dimensional Scaffolds for Tissue Engineering: The Importance of Uniformity in Pore Size and Structure," *Langmuir*, vol. 21, pp. 19001-19006, 2010.
- [30] S. Yang, K. Leong, Z. Du and C. Chua, "The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors," *Tissue Engineering*, pp. 679-689, 2001.
- [31] Y. Zhang, S. Wang, M. Eghtedari, M. Motamedi and N. Kotov, "Inverted-Colloidal-Crystal Hydrogel Matrices as Three-Dimensional Cell Scaffolds," *Advanced Functional Materials*, pp. 725-731, 2005.
- [32] J. P. Vacanti, M. A. Morse, W. M. Saltzman, A. J. Domb, A. Perezatayde, R. Langer, C. L. Mazzone and C. K. Breuer, "Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices.," *J. Pediatr. Surg.*, vol. 23, pp. 3-9, 1988.
- [33] N. Kotov, S. Shanbhag and J. W. Lee, "Diffusion in three-dimensionally ordered scaffolds with inverted colloidal crystal geometry," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 5581-5585, 2005.
- [34] N. Kotov, L. Y. S. Wang, C. Cumming, M. Eghtedari, G. Vargas, M. Motamedi, J. Nichols and J. Cortiella, "Inverted colloidal crystals as three-dimensional cell scaffolds.," *Langmuir*, vol. 20, pp. 7887-7892, 2004.
- [35] Y. Zhang, S.-W. Choi and Y. Xia, "Modifying the Pores of an Inverse Opal Scaffold With Chitosan Microstructures for Truly Three-Dimensional Cell Culture," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 33, pp. 296-301, 2012.
- [36] S. Choi, J. Xie and Y. Xia, "Chitosan-Based Inverse Opals: Three-Dimensional Scaffolds with Uniform Pore Structures for Cell Culture," *Adv Mater*, vol. 21, pp. 2997-3001, 2009.
- [37] Y. Xia, B. Gates, Y. Yin and Y. Lu, "Monodispersed Colloidal Spheres: Old Materials with New Applications," *Advanced Materials*, vol. 12, pp. 693-713, 2000.
- [38] F. Bai, X. Yang, Y. Zhao and H. W, "Synthesis of core-shell microspheres with active hydroxyl groups by two-stage precipitation polymerization.," *Polymer International*, vol. 54, pp. 168-174, 2005.
- [39] Y. Jin, M. Jiang, Y. Shi, Y. Lin, Y. Peng and K. Dai, "Narrowly dispersed molecularly imprinted microspheres prepared by a modified precipitation polymerization method.," *Analytica chimica acta*, pp. 105-113612, 2008.
- [40] M. Flake, P. Nguyen, R. Scott, L. Vandiver, R. Willits and D. Elbert, "Poly(ethylene glycol) microparticles produced by precipitation polymerization in aqueous solution.," *Biomacromolecules*, vol. 12, pp. 844-850, 2011.

- [41] Q. Liu, Y. Li, S. Shen, Z. Zhou, B. Ou and S. Tang, "Preparation of Monodisperse Cationic Microspheres by Dispersion Polymerization of Styrene and a Cation-Charged Monomer in the Absence of a Stabilizer.," *Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and Applied Chemistry*, vol. 48, pp. 518-525, 2011.
- [42] A. Abdelrahman, S. Dai, S. Thickett, O. Ornatsky, D. Bandura and V. Baranov, "Lanthanide-containing polymer microspheres by multiple-stage dispersion polymerization for highly multiplexed bioassays," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, pp. 15276-15283, 2009.
- [43] S. (. Johan and M. Dekker, "Encyclopedic handbook of emulsion technology," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 55, p. 361, 2003.
- [44] Y. Gao, F.-d. Cui, Y. Guan, L. Yang, Y.-s. Wang and L.-n. Zhang, "Preparation of roxithromycin-polymeric microspheres by the emulsion solvent diffusion method for taste masking.," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 318, pp. 62-69, 2006.
- [45] K. Tokuoka, M. Senna and H. Kung, "Preparation of inorganic/polymeric composite microspheres by direct suspension polymerization.," *Journal of Materials Science*, vol. 21, pp. 493-496, 1986.
- [46] H. Jung, E. Lee, B. Ji, Y. Deng, J. Yun and J. Yeum, " Poly(vinyl acetate)/poly(vinyl alcohol)/montmorillonite nanocomposite microspheres prepared by suspension polymerization and saponification.," *Colloid and Polymer Science*, vol. 285, pp. 705-710, 2007.
- [47] M. Islam, J. Yeum and A. Das, " Synthesis of poly(vinyl acetate-methyl methacrylate) copolymer microspheres using suspension polymerization.," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 368, pp. 400-405, 2012.
- [48] B. Gangar, K. Nagarajan, R. Krishnan and A. Pandit, "Studies of internal gelation for the production of microspheres: sonication assisted gelation.," *Ultrasonics sonochemistry*, vol. 18, pp. 250-257, 2011.
- [49] M. Das and D. Maurya, "Microencapsulation of Water-Soluble Drug by Emulsification-Internal Gelation Technique.," *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol. 43, pp. 28-38, 2009.
- [50] S. Choi, I. Cheong, J.-H. Kim and Y. Xia, "Preparation of Uniform Microspheres Using a Simple Fluidic Device and Their Crystallization into Close-Packed Lattices.," *Small*, vol. 5, pp. 454-459, 2009.
- [51] S. Takeuchi, P. Garstecki, D. Weibel and G. Whitesides, "An Axisymmetric Flow-Focusing Microfluidic Device.," *Advanced materials*, vol. 17, pp. 1067-1072, 2005.
- [52] L. Zhu, Y. Li, Q. Zhang, H. Wang and M. Zhu, "Fabrication of monodisperse, large-sized,

- functional biopolymeric microspheres using a low-cost and facile microfluidic device.," *Biomedical Microdevices*, vol. 12, pp. 169-177, 2010.
- [53] H. Zhang, X.-J. Ju, R. Xie, C.-J. Cheng, P.-W. Ren and L.-Y. Chu, "A microfluidic approach to fabricate monodisperse hollow or porous poly(HEMA-MMA) microspheres using single emulsions as templates," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 336, pp. 235-243, 2009.
- [54] S. Choi, Y. Yeh, Y. Zhang, H. Sung and Y. Xia, "Uniform beads with controllable pore sizes for biomedical applications," *Small*, vol. 6, pp. 1492-1498, 2010.
- [55] R. Morrison and R. Boyde, "Macromoléculas, Polímros e Polimerização," *Química Orgânica*, no. Morrison, R. and R. Boyd, Macromoléculas. Polímeros e Polimerização, in *Química Orgânica*, F.C. Gulbenkian, Editor. 1996: Lisboa. p. 1207-1237., pp. 1207-1237, 1996.
- [56] Y. S. Nam and T. G. Park, "Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation," *John Wiley & Sons*, pp. 8-17, 1999.
- [57] N. Dziomkina, M. Hempenius and G. Vancso, "Synthesis of cationic core-shell latex particles.," *European Polymer Journal*, vol. 42, pp. 81-91, 2006.
- [58] D. Grier, "Interactions in Colloidal Suspensions: Electrostatics, Hydrodynamics and their Interplay," *Behrens SH*, pp. 1-28, 2001.
- [59] O. Velev and A. Lenhoff, "Colloidal crystals as templates for porous materials," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 5, pp. 56-63, 2000.
- [60] O. Velev, T. Jede, R. Lobo and A. Lenhoff, "Porous silica via colloidal crystallization," *Nature*, vol. 389, pp. 447-448, 1997.
- [61] S. Park and Y. Xia, "Fabrication of three-dimensional macroporous membranes with assemblies of microspheres as templates," *Chem Mater*, vol. 10, pp. 1745-1747, 1998.
- [62] P. Brown and P. Wiltzius, "Electrochemically grown photonic crystals," *Nature*, vol. 402, pp. 603-604, 1999.
- [63] H. Yan, C. Blanford, B. Holland, W. Smyrl and A. Stein, "General synthesis of periodic macroporous solids by templated salt precipitation and chemical conversion.," *Chem Mater*, vol. 12, pp. 1134-1141, 2000.
- [64] M. Antonietti, B. Berton, C. Goltner and H.-P. Hentze, "Synthesis of mesoporous silica with large pores and bimodal pore size distribution by templating of polymer lattices.," *Adv Mater*, vol. 10, pp. 154-159, 1998.
- [65] B. Holland and C. S. A. Blanford, "A synthesis of macroporous minerals with highly ordered

- three-dimensional arrays of spheroidal voids.," *Science*, vol. 281, pp. 538-540, 1998.
- [66] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2529-2543, 2000.
- [67] K. Takagi, T. Takahashi, K. Kikuchi and Kawasaki, "A. Fabrication of bioceramic scaffolds with ordered pore structure by inverse replication of assembled particles.," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 30, pp. 2049-2055, 2010.
- [68] M. Cuddihy and N. Kotov, "Poly(lactic-co-glycolic acid) Bone Scaffolds with Inverted Colloidal Crystal Geometry.," *Tissue Engineering Part A.*, vol. 14, pp. 1639-1649, 2008.
- [69] J. Nichols, J. Cortiella, J. Lee, J. Niles, M. Cuddihy and S. Wang, " In vitro analog of human bone marrow from 3D scaffolds with biomimetic inverted colloidal crystal geometry.," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 1071-1079, 2009.
- [70] S. Choi, Y. Zhang, S. Thomopoulos and Y. Xia, "In Vitro Mineralization by Preosteoblasts in Poly(dl-lactide-co-glycolide) Inverse Opal Scaffolds Reinforced with Hydroxyapatite Nanoparticles.," *Langmuir*, vol. 26, pp. 12126-12131, 2010.
- [71] K. Groot, C. Klein and J. Wolke, "Chemistry of calcium phosphate bioceramics.," *Boca Raton*, vol. II, pp. 3-19, 1990.
- [72] L. Hench, "Bioceramics: from concept to clinic," *J Am Ceram Soc*, vol. 74, pp. 1487-1510, 1991.
- [73] L. Chenguang, T. Yulong, L. Chengsheng, C. Xiguang and Y. Lejun, "Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery," *Journal of Ocean University of China*, vol. 6, pp. 237-243, 2007.
- [74] K. Kushwaha, A. Rai and S. Singh, "Chitosan: A platform for Targeted Drug Delivery," *International Journal of PharmTech research*, pp. 2271-2282, 2010.
- [75] D. Puppi, "Polymeric materials for bone and cartilage repair.," *Progress in Polymer Science*, vol. 35, pp. 403-440, 2010.
- [76] M. Rinaudo, "Characterization and Properties of Some Polysaccharides Used as Biomaterials.," *Macromolecular Symposia*, vol. 245, pp. 549-557, 2006.
- [77] van Blitterswijk, "Natural Polymers in tissue engineering applications," in *Tissue Engineering*, 2008, pp. 155-160.
- [78] P. VandVord and H. Matthew, "Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 59, pp. 585-590, 2002.
- [79] B. D. Ratner, A. S. Hoofman, F. J. Schoen and J. E. Lemons, "Classes of materials used in

- medicine," in *Biomaterial Science*, Elsevier, Inc., 2004, p. 105.
- [80] S. Saxena, "Polyvinyl Alcohol (PVA)," *Chemical and Technical Assessment*, pp. 1-3, 2004.
- [81] R. v. Dijkhuizen-Radersma, L. Moroni, A. v. Apeldoorn, Z. Zhang and D. Grijpma, "Degradable polymers for tissue engineering," in *Tissue Engineering*, 2008, pp. 193-221.
- [82] L. Fambri and et al, "Biodegradable Polymers," in *Integrated Biomaterials Science*, 2002, pp. 119-187.
- [83] P. Ducheyne, "Polymers," in *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier Ltd., 2011, p. 442.
- [84] D. Williams, "Biocompatibility," in *Tissue Engineering*, Academic Press Series in Biomedical Engineering, 2005, pp. 256-276.
- [85] F. M. Veronese and P. Caliceti, "Drug Delivery Systems," in *Integrated Biomaterials Science*, 2002, p. 843.
- [86] B. Ratner, "Properties of soft materials," in *Biomaterial Science*, Elsevier Academic Press, 2004, p. 820.
- [87] Mitchell and B. S., "Structure of Some Common Polymers," in *An introduction to materials engineering and science*, Canada, Wiley Interscience, 2004, p. 855.
- [88] B. S. Mitchell, "The Structure of Materials," in *An Introduction to Materials Engineering and Science*, Wiley-Interscience, 2004, p. 80.
- [89] L. Fambri, C. Migliaresi, K. Kesenci and E. Piskin, "Biodegradable Polymers," in *Integrated Biomaterials Science*, 2002, pp. 119-187.
- [90] H. Chen, B. H. Clarkson, K. Sun and J. F. Mansfield, "Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods prism-like structure," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 288, pp. 97-103, 2005.
- [91] W.-C. Hsieha, C.-P. Chang and S.-M. Lin, "Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 57, pp. 250-255, 2007.
- [92] "Archimedes' Principle and Specific Density," [Online]. Available: http://www.physics.arizona.edu/physics/gdresources/documents/13_Archimedes.pdf. [Acedido em 23 03 2013].
- [93] W. Groenewoud, "Differential Scanning Calorimetry," in *Characterisation of Polymers by Thermal Analysis*, Elsevier, 2005, pp. 9-60.
- [94] R. F. Egerton, "The Scanning Electron Microscope," in *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*, Springer Science+Business Media,

- Inc., 2005, p. chapter 5.
- [95] T. N. Corporation, "Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry," 2001. [Online]. Available: <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>. [Accessed 07 03 2013].
- [96] "X-ray Diffraction (XRD)," [Online]. Available: <http://web.pdx.edu/~pmoeck/phy381/Topic5a-XRD.pdf>. [Accessed 07 03 2013].
- [97] A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, H. A. Stone and D. A. Weitz, "Dripping to Jetting Transitions in Coflowing Liquid Streams," *Physical review letters*, vol. 99, pp. 1-4, 2007.
- [98] Y. Liu, D. Hou and G. Wang, "A simple wet chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 86, pp. 69-73, 2004.
- [99] R. M., M. S. N. and R. V., "Preparation of size controlled, stoichiometric and bioresorbable hydroxiapatite nanorod by varying initial pH, Ca/P ratio and sintering temperature," *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, vol. 6, pp. 169-179, 2011.
- [100] M. D. Innocentinia, V. R. Salvini, A. Macedo and V. C. Pandolfelli, "Prediction of Ceramic Foams Permeability Using Ergun's Equation," *Materials Research*, vol. 2, 1999.
- [101] A. R. Center, "Crystal Structures," [Online]. Available: https://www.iit.edu/arc/workshops/pdfs/Crystal_Structures.pdf. [Acedido em 01 04 2013].
- [102] L. J. Gibson and M. F. Ashby, *Cellular Solids - Structure and Properties* (Cambridge Solid State Science Series), Cambridge University Press, 1999.
- [103] G. Weia and P. X. Ma, "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 4749-4757, 2004.

Anexos

Anexo A

**McCOY'S 5A MEDIUM [MODIFIED]**

With L-Glutamine, Without Sodium Bicarbonate
Product Number **M4892**

Product Description

In 1959, McCoy and his coworkers reported the amino acid requirements for in vitro cultivation of Novikoff Hepatoma Cells. These studies were performed using Basal Medium 5A and subsequently modified to create a new medium known as McCoy's 5A Medium.

Components	g/L
L-Alanine	0.01336
L-Arginine•HCl	0.04214
L-Asparagine•H ₂ O	0.04503
L-Aspartic Acid	0.01997
L-Cysteine	0.02424
L-Glutamic Acid	0.02207
L-Glutamine	0.21915
Glycine	0.00751
L-Histidine•HCl•H ₂ O	0.02096
Hydroxy-L-proline	0.01967
L-Isoleucine	0.03936
L-Leucine	0.03936
L-Lysine•HCl	0.03654
L-Methionine	0.01492
L-Phenylalanine	0.01652
L-Proline	0.01727
L-Serine	0.02628
L-Threonine	0.01787
L-Tryptophan	0.00306
L-Tyrosine•2Na•2H ₂ O	0.0261
L-Valine	0.01757
Ascorbic Acid	0.0005625
p-Aminobenzoic Acid	0.001
D-Biotin	0.0002
Choline Chloride	0.005
Folic Acid	0.01
myo-Inositol	0.036
Niacinamide	0.0005
Nicotinic Acid	0.0005
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.0002
Pyridoxal•HCl	0.0005
Pyridoxine•HCl	0.0005
Riboflavin	0.0002
Thiamine•HCl	0.0002
Vitamin B-12	0.002
Calcium Chloride (anhydrous)	0.09995
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.0976876
Potassium Chloride	0.4
Sodium Chloride	6.46
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.504
Peptone	0.6
D-Glucose	3.0
Glutathione (reduced)	0.0005
Phenol Red•Na	0.011

Precautions and Disclaimer

REAGENT

For R&D use only. Not for drug, household or other uses.

Preparation Instructions

Powdered media are hygroscopic and should be protected from moisture. The entire contents of each package should be used immediately after opening. Preparing a concentrated solution of medium is not recommended as precipitates may form. Supplements can be added prior to filtration or introduced aseptically to sterile medium.

1. Measure out 90% of final required volume of water. Water temperature should be 15-20°C.
2. While gently stirring the water, add the powdered medium. Stir until dissolved. Do NOT heat.
3. Rinse original package with a small amount of water to remove all traces of powder. Add to solution in step 2.
4. To the solution in step 3, add 2.2 g sodium bicarbonate or 29.3 ml of sodium bicarbonate solution [7.5%w/v] for each liter of final volume of medium being prepared. Stir until dissolved.
5. While stirring, adjust the pH of the medium to 0.1-0.3 pH units below the desired pH since it may rise during filtration. The use of 1N HCl or 1N NaOH is recommended.
6. Add additional water to bring the solution to final volume.
7. Sterilize immediately by filtration using a membrane with a porosity of 0.22 microns.
8. Aseptically dispense medium into sterile container.

Storage and Stability

Store the dry powdered medium at 2-8 °C under dry conditions and liquid medium at 2-8 °C in the dark. Deterioration of the powdered medium may be recognized by any or all of the following: [1] color change, [2] granulation/clumping, [3] insolubility. Deterioration of the liquid medium may be recognized by any or all of the following: [1] pH change, [2] precipitate or particulates, [3] cloudy appearance [4] color change. The nature of supplements added may affect storage conditions and shelf life of the medium. Product label bears expiration date.

Procedure

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED
Water for tissue culture use [W3500]
Sodium Bicarbonate [S5761] or
Sodium Bicarbonate Solution, 7.5% [S8761]
1N Hydrochloric Acid [H9892]
1N Sodium Hydroxide [S2770]
Medium additives as required

References

1. McCoy, T.A., Maxwell, M. and Kruse, P.F., (1959). Amino Acid Requirement of the Novikoff Hepatoma *in vitro*. Proc. Soc Exp. Biol. Med. 100, 115-118.

Revised: May 2007

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

Sigma-Aldrich Inc.
3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765
Technical Service: 800-325-5832 or call collect 314-771-5765
Or e-mail at techserv@sial.com
To order: 800-325-3010 or call collect 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

Anexo B

Protocolos de Cultura de Células Animais

1. Regras Básicas

As regras básicas de trabalho com células animais são regras de bom senso e têm como objectivo a protecção das células e do operador.

1.1 Utilizar equipamento de protecção pessoal: bata de utilização exclusiva no laboratório de cultura; luvas; cobrir sapatos; touca para o cabelo.

1.2 Limpar as superfícies com etanol ou isopropanol a 70% entre operações e esperar 30 minutos entre a manipulação de diferentes linhagens celulares.

1.3 Etiquetar adequadamente todos os frascos de cultura e de reagentes com o conteúdo e data de preparação.

1.4 Lidar apenas com uma linha celular de cada vez para reduzir a possibilidade de contaminação cruzada e erros de etiquetagem.

1.5 Usar frascos de meio de cultura diferentes para linhas celulares diferentes.

1.6 Examinar as culturas diariamente para a presença de contaminantes como bactérias e fungos.

1.7 Evitar o uso contínuo de antibióticos no meio de cultura pois isto pode levar ao aparecimento de organismos resistentes aos antibióticos.

1.8 Efectuar as calibrações e manutenções periódicas ao equipamento essencial (em particular a câmara de segurança microbiológica e a incubadora de CO₂).

1.9 Manter os banhos limpos e desinfectados através de limpeza periódica.

1.10 Manter o material organizado e arrumado, evitando a utilização de contentores de cartão.

1.11 Não deixar acumular lixo, em particular na câmara de segurança microbiológica.

1.12 Não ter muita gente a trabalhar no laboratório em simultâneo.

1.13 Evitar usar células de linhas não autenticadas.

1.14 Novas linhas celulares devem ser mantidas em quarentena até os testes de controlo de qualidade estarem concluídos.

1.15 Não usar meio de cultura fora do prazo de validade. Após a adição de glutamina e soro ao meio de cultura, o prazo de validade deste é de 4 a 6 semanas a 4°C. O glutamax (da Invitrogen, e um dipeptídeo de L-alanina e L-glutamina) é estável.

1.16 Não manter as células em cultura contínua, criopreservar as células quando não forem necessárias durante longos períodos de tempo (algumas semanas).

2. Técnica asséptica

O objectivo de observar uma boa técnica asséptica é que as culturas realizadas se mantenham livres de contaminantes como bactérias, fungos e micoplasma e a contaminação cruzada entre linhas celulares.

Materiais:

- etanol ou isopropanol a 70 % (v/v)
- hipoclorito de sódio (NaClO, lixívia)

Equipamento:

- equipamento de protecção pessoal (bata, luvas, cobrir sapatos, touca)
- câmara de segurança microbiológica (CSM)

Procedimento:

Antes de iniciar o trabalho:

- desinfectar a superfície de trabalho da CSM pulverizando-a com etanol a 70% e limpando com papel absorvente;
- desinfectar as luvas com etanol a 70% e deixar secar ao ar durante 30 s;
- colocar todos os materiais e equipamento necessários no interior da CSM. Todo o material e equipamento que é colocado no interior na CSM durante os procedimentos (frascos de meio, caixas com pontas de pipetas, micropipetas, pipetador automático, etc) deve ser pulverizado com etanol a 70%.

Durante o trabalho, não contaminar as luvas tocando em objectos fora da CSM (em particular a cara e o cabelo). Se as luvas forem contaminadas, voltar a pulverizá-las com etanol a 70%.

Descartar as luvas após trabalhar com culturas contaminadas e no final dos procedimentos.

Os movimentos nas imediações e no interior da CSM devem ser lentos mas determinados de modo a não perturbar o fluxo laminar de ar.

Após terminar o trabalho, desinfectar todo o material e equipamento usado no interior da

CSM antes de o retirar para o exterior. Limpar a superfície de trabalho com etanol e secar com papel absorvente.

O meio de cultura deve ser descartado numa solução de lixívia a 1% e deixado no interior da CSM durante 2 horas após o que pode ser descartado pelo esgoto juntamente com água abundante.

3. Subcultura de uma linha de células aderentes.

Em resumo:

- Avaliar as culturas
- Retirar o meio de cultura
- Lavar as células com PBS sem cálcio nem magnésio. Repetir se necessário
- Aplicar enzima (TrypLE) sobre as células, espalhar e decantar o excesso
- Incubar 2 a 10 minutos
- Examinar as células
- Re-suspender em meio novo
- Transferir as células para meio novo e aquecido
- Recolocar na incubadora de CO₂

Objectivo:

As linhas de células aderentes crescem *in vitro* até que toda a superfície disponível para a adesão das células esteja coberta por células (diz-se que a cultura atingiu a confluência) ou até que os nutrientes se tenham esgotado. Quando a cultura está a cerca de 70 a 80% da confluência, as células devem ser passadas para um novo frasco de cultura para evitar que as células cessem a divisão e a cultura acabe por morrer. Para realizar a passagem, as células devem ser soltas do substrato e colocadas em suspensão. O grau de adesão das células ao substrato depende tanto do substrato como da linha celular. Em geral, usa-se uma protease (a tripsina) para cortar as ligações das células ao substrato. Nalgumas situações este procedimento pode não ser adequado, por exemplo se as células forem muito sensíveis às proteases ou se quisermos preservar marcadores ou receptores da membrana citoplasmática. Nestes casos, deve usar-se um raspador mecânico.

Materiais:

- meio de cultura pré-aquecido a 37°C
- etanol a 70%
- PBS sem cálcio nem magnésio
- tripsina (TrypLE)

- azul tripano

Equipamento:

- equipamento de protecção pessoal
- banho de água quente regulado para 37°C
- câmara de segurança microbiológica
- incubadora de CO₂
- frascos de cultura rotulados
- microscópio invertido com contraste de fase
- centrífuga
- hemocitómetro
- marcadores
- pipetas e pontas para micropipetas
- suporte para frascos de 15 e 50 ml
- papel de limpeza

Procedimento:

1. Observar as culturas no microscópio invertido para determinar o grau de confluência das células e confirmar a ausência de contaminação microbiana e fúngica.
2. Remover o meio de cultura com uma pipeta. Atenção para não tocar na camada de células com a ponta da pipeta.
3. Lavar a camada de células com PBS sem cálcio nem magnésio usando um volume igual a cerca de metade do meio de cultura usado. Repetir este passo se as células aderirem fortemente ao substrato.

4. Pipetar a tripsina previamente aquecida usando 0,5 ml de tripsina por cada 25 cm² de área de cultura. Abanar o frasco ligeiramente para espalhar a tripsina sobre todas as células. Decantar ou pipetar o excesso de tripsina.
5. Colocar o frasco de cultura a incubar a 37 °C durante cerca de 5 min na incubadora.
6. Examinar as células com um microscópio invertido para certificar que as células se destacaram e estão em suspensão. As paredes laterais do frasco de cultura podem ser levemente percutidas para ajudar a libertar as células ainda aderidas.
7. Diluir a tripsina com 2 ml de meio de cultura completo. Retirar 100 µl e efectuar uma contagem de células. Transferir a suspensão de células para um frasco de centrifuga de 15 ml.
8. Centrifugar as células a 100 g durante 10 min ou 150 g durante 5 min. Descartar o sobrenadante e re-suspender o grânulo de células em 2 ml de meio fresco.
9. Transferir para um novo frasco de cultura etiquetado a quantidade de células adequada. Semear as células de acordo com a densidade recomendada (1-3x10,000 células/cm² para as 3T3; 2,5-7,5x100,000 células num frasco de 25 cm²).
10. Colocar o frasco de cultura na incubadora.

4. Contagem de células.

Em resumo:

- Suspender as células
- Retirar 100 µl para um microtubo
- Adicionar igual quantidade de azul tripano (factor de diluição 2)
- Preparar o hemocitómetro
- Encher a câmara de contagem
- Contar as células
- Calcular a concentração

Objectivo:

Em muitos procedimentos, como a subcultura e a criopreservação, é necessário quantificar o número de células antes da sua utilização. Usar um número adequado e consistente de células

ajuda a manter um crescimento óptimo e a padronizar os procedimentos de cultura. Isto permite obter resultados com melhor reprodutibilidade.

Materiais:

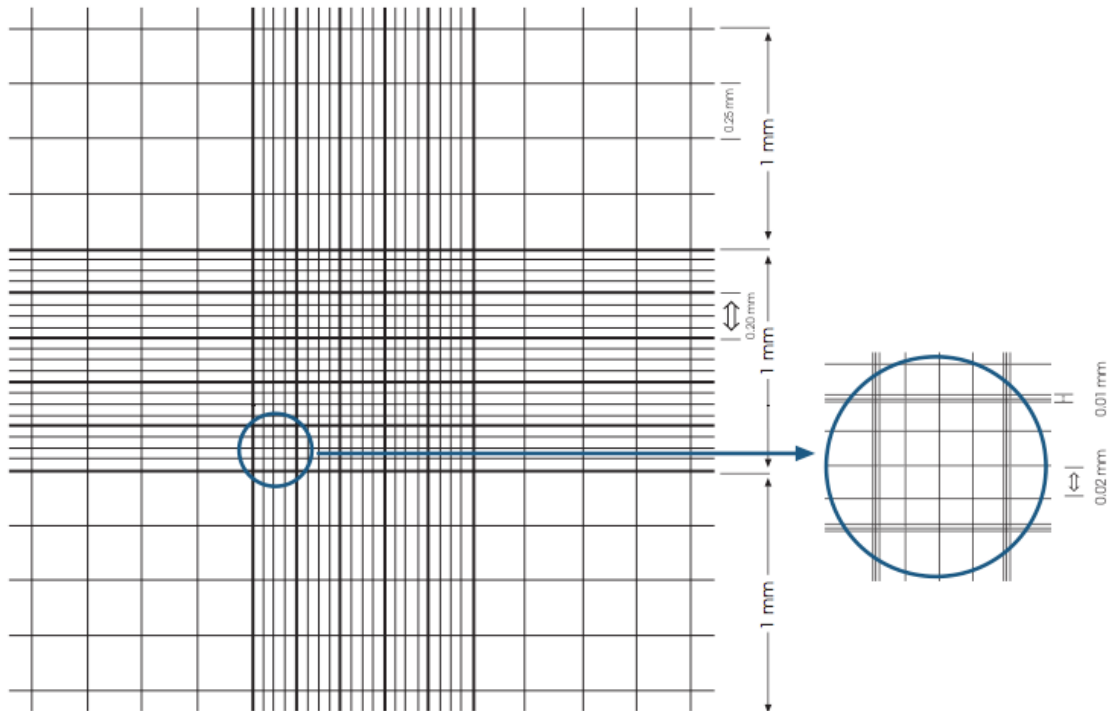
- meio de cultura pré-aquecido a 37°C
- etanol a 70%
- azul tripano a 0,4% em solução salina

Equipamento:

- equipamento de protecção pessoal
- banho de água quente regulado para 37°C
- câmara de segurança microbiológica
- microscópio invertido com contraste de fase
- centrífuga
- hemocitómetro
- pipetas e pontas para micropipetas
- microtubos e suportes
- papel de limpeza

Procedimento:

1. Retirar 100 µl de suspensão de células para um microtubo.
2. Adicionar igual quantidade de azul tripano (factor de diluição 2x) e misturar pipetando gentilmente.
3. Limpar o hemocitómetro. Humedecer uma lamela e colocá-la sobre o hemocitómetro.
4. Encher as duas câmaras de contagem do hemocitómetro com a suspensão celular (cerca de 7 a 8 µl) e observar num microscópio invertido com contraste de fase usando uma ampliação de 20x.
5. Contar o número de células viáveis (pequenas esferas brilhantes) e células não viáveis (pequenas esferas azuladas). Idealmente, devem contar-se mais de 100 células de modo a aumentar o rigor da determinação da percentagem de células viáveis. Anotar o número de quadrados usados para obter a contagem de células superior a 100.
6. Calcular a concentração e a percentagem de células viáveis e não viáveis.



A concentração de células viáveis (número de células por mililitro) é igual a:

$$\frac{\text{número de células viáveis contadas}}{\text{número de quadrados com 1 mm de lado contados}} \times \text{diluição} \times 10\,000$$

A concentração de células não viáveis (número de células mortas por mililitro) é igual a:

$$\frac{\text{número de células não viáveis contadas}}{\text{número de quadrados com 1 mm de lado contados}} \times \text{diluição} \times 10\,000$$

A percentagem de células viáveis é igual a:

$$\frac{\text{número de células viáveis contadas}}{\text{número total de células contadas}} \times 100$$

Notas:

1. O azul tripano é tóxico e um potencial carcinogénio. Usar equipamento de protecção pessoal adequado e não inspirar os vapores.
2. A área do quadrado central da câmara de contagem é igual a 1 mm². Esta área está dividida em 25 quadrados menores. Cada um destes quadrados está rodeado de uma linha tripla e está subdividido em 16 quadrados.

3. A espessura da câmara de contagem é de 0,1 mm.
4. O factor 10 000 resulta de converter o volume da câmara de contagem (0,1 mm³) para ml.
5. Fontes de incerteza a ter em atenção:
 - a presença de bolhas de ar e de fragmentos de células na zona de contagem
 - enchimento excessivo ou incompleto da câmara
 - células não uniformemente distribuídas na câmara
 - poucas células para contar (este problema pode ser resolvido centrifugando as células e re-suspendendo-as num volume menor)
 - demasiadas células para contar (usar uma diluição com o azul tripano superior a 2)

Anexo C

Tabela 14 - Resultados dos testes de compressão aos ICCs e às suas paredes.

n	Fração Volúmica		Módulo de Young	Tensão de colapso	Extensão de densificação
	Quitosano	Hidroxiapatite	E (KPa)	σ^* (KPa)	ϵ_d
5					–
ICC	1,00	0,00	99 ± 17	16 ± 4	0,459 ± 0,026
	0,86	0,14	171 ± 57	28 ± 3	0,376 ± 0,016
	0,67	0,33	242 ± 19	10 ± 0,8	0,753 ± 0,013
	0,50	0,50	96 ± 4	52 ± 6	0,804 ± 0,011
Paredes	1,00	0,00	557 ± 173	87 ± 17	0,736 ± 0,031
	0,86	0,14	664 ± 276	29 ± 12	0,801 ± 0,019
	0,67	0,33	248 ± 91	63 ± 14	0,879 ± 0,015
	0,50	0,50	544 ± 58	79 ± 35	0,864 ± 0,028