



**Luís Miguel Lopes Martins**

Mestrado Integrado em Engenharia de Materiais

# Réplicas Invertidas de Cristais Coloidais à base de cimentos de Brushite para a Regeneração óssea

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia de Materiais

Orientador: Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges,  
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Coorientador: Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva,  
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri

Presidente:

Arguente:



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2018



Copyright © Luís Miguel Lopes Martins, 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.



‘If i have seen further it is by standing on the shoulders of Giants.’

Isaac Newton



# Agradecimentos

Esta dissertação foi elaborada no Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologias, FCT/UNL, e como tal a sua realização não seria possível sem os recursos disponibilizados. O primeiro agradecimento é dirigido à instituição, e todos docentes constituintes, que permitiram a realização desta dissertação, não só pelas condições prestadas, mas toda a experiência que foi a passagem por este estabelecimento de ensino, ao longo dos meus anos de formação académica, e tudo o que ele acrescentou na minha vida.

Porém não me é possível não destacar um elemento crucial do meu percurso académico. Ao meu orientador, Professor João Paulo Borges, agradeço não só a oportunidade de trabalhar neste projeto, tudo o apoio prestado e disponibilidade, não só durante a dissertação, mas no decorrer de todo o curso.

Ao coorientador Professor Jorge Carvalho Silva, pelo acompanhamento e trabalho laboratorial prestado, um sincero agradecimento pelo incansável apoio.

Ao Francisco Ferreira, ao Diogo Serranito e ao Dmytro Besprozvanny, agradeço pela camaradagem com que me presentearam ao longo dos nossos anos conjuntos de curso, por todas as experiências partilhadas e dificuldades ultrapassadas em equipa.

Ao Filipe Santos, Fábio Mano, André Parreira, João Casaca e Miguel Cabano, meus velhos amigos, que me acompanharam durante longos anos, cujos objetivos, aspirações e boas memórias partilhámos, deixo-vos um agradecimento saudadoso.

Ao meu treinador, tutor e acima de tudo amigo, Hugo Barracha, que me influenciou mais que todos, a perseguir a glória e no fundo, colocou-me no caminho que resultou na pessoa em que me tornei. Pelas lições, horas, suor e lágrimas. Dedicção! Força de vontade! Vontade de querer! É demais para enumerar... Mas não menos, não um agradecimento, mas a confirmação que tudo valeu a pena. De ti levo a incansável busca pelo sal da vida.

Ao melhor dos melhores amigos, a ti Tiago Emanuel da Silva, que me acompanhas há anos demais... que me conheceste antes de eu me conhecer a mim mesmo, companheiro de uma vida, que embora os nossos percursos nem sempre coincidiram, nunca foram obstáculo para a nossa amizade, e creio eu que nunca encontraremos um. Se ainda compartilharmos tantos anos quanto os que já fizemos, certamente ver-nos-

emos tornar velhos! Tu não és aquele amigo que conhece todas as minhas histórias, tu és aquele que está em todas! Obrigado!

A ti Inês Sofia da Filomena, tu que me apoiaste não só nos melhores, mas nos piores momentos, no nosso ainda curto, mas não menos importante percurso. Sem ti esta tese não teria sido possível. Obrigado por me aturares naqueles longos telefonemas. Agradeço-te por tudo! E mais... porque sei que o melhor está para vir!

À minha família, e em especial ao meu avô, Joaquim Lopes, que todos os netos possam ter alguém como tu na sua vida. Obrigado a todos por terem participado na minha vida.

Aos meus pais, Cristina e José, obrigado... bem por tudo literalmente! Obrigado por me terem tornado em quem sou hoje, e obrigado pelo que sempre foram para mim! Não vos posso agradecer o suficiente, mas devo-vos tudo!

Por fim, os mais importantes! A ti Cláudia Filipa Lopes Martins. A ti Rafael Lopes Martins. Vocês são o meu orgulho! São o melhor de mim! São mais do que alguma vez poderei ser! São tudo e mais, e mais, e mais! São as melhores pessoas para ter ao lado uma vida! Obrigado por existirem!

# Resumo

O interesse dos grupos científicos e de investigação, pela área de engenharia de tecidos e medicina regenerativa, subiu em resposta ao presente incremento do investimento nesta área. A presente dissertação visa o desenvolvimento de um substituto ósseo, que constitua uma opção viável aos métodos clínicos estabelecidos de utilização de enxertos. Dentro dos cimentos de fosfato de cálcio, que apresentam excelentes resultados em termos de biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade e na sua capacidade osteogénica, a brushite apresenta-se como material de eleição, uma vez que melhor se coaduna com o ritmo de formação de novo osso.

Assim sendo, o que se propõe neste estudo, é a produção de uma réplica invertida de cristal coloidal (ICC) à base de brushite, que funcione como *scaffold* e promova a regeneração óssea. Os cristais coloidais foram obtidos pela produção de microesferas de poliestireno e conseqüente enformação. Os melhores resultados na produção dos ICC's foram obtidos, com a impregnação de cimentos de brushite aditivados com glicerol a 7.5% p/p. Também, rácios de líquido-sólido de 0.35 ml/g promovem melhores resultados. A presença de beta-fosfato tricálcico não reagido foi detetada por DRX, e expectável de acordo com a formulação do cimento, intencionalmente não equimolar, funcionando este como reforço da brushite. Os ICC's de brushite apresentam um módulo de Young médio de aproximadamente 2 MPa, e uma tensão de colapso de 215kPa. Estes valores aproximam-se aos valores previstos pelo modelo matemático de Gibson-Ashby para espumas de deformação plástica com células abertas. Os ensaios celulares demonstraram a inexistência de comportamento citotóxico, para concentrações de extrato de 27 mg/ml. A taxa de adesão celular aos ICC's é de 50%. A proliferação celular nos ICC's apresenta valores de 259%, para uma para uma avaliação ao longo de um período de 13 dias

**Palavras-chave:** engenharia de tecidos, réplicas invertidas de cristais coloidais, brushite, *scaffold*.



# Abstract

The interest of the scientific and investigation teams, towards the tissue engineering and regenerative medicine, is rising in response to the nowadays increasing investments. The present thesis looks for the development of a bone filler, which could provide a viable option to the established clinic methods using grafts. Among the calcium phosphate, which have excellent results in terms of biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity and osteogenic capability, the brushite shows up as the optimal choice, since it better syncs with the times of native bone formation.

Therefore, this study proposes the production of an inverted colloidal crystal, ICC, from brushite, which works as a scaffold and promote bone regeneration. The colloidal crystals were created through the assembling of polystyrene microspheres. The best result, to produce the ICC scaffold, was obtained for brushite cements with glycerol at 7.5% wt. Also, liquid-powder ratios of 0.35 ml/g result in better ICC's scaffolds. The presence of unreacted beta tricalcium phosphate was detected through DRX, since the formulation of the cement is intentionally not equimolar, behaving this as a reinforcement. The ICC's scaffolds have an Young module of about 2 MPa, and a collapse stress of 215 kPa. These values meet the ones obtained through the Gibson-Ashby mathematical model, for foams with plastic deformation and open cells. The cellular tests prove that the ICC's don't exhibit a cytotoxic behavior, for a 27 g/ml extract. The cellular adhesion is of about 50%. The cellular proliferation in the ICC's has values of 259%, for a 13 days period test.

**Keywords:** tissue engineering, inverted colloidal crystal, brushite, scaffold.



# Índice Geral

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Agradecimentos</b> .....   | <b>v</b>    |
| <b>Resumo</b> .....   | <b>vii</b>  |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>ix</b>   |
| <b>Índice Geral</b> .....   | <b>xi</b>   |
| <b>Índice de Tabelas</b> .....  | <b>xiii</b> |
| <b>Índice de Figuras</b> .....  | <b>xv</b>   |
| <b>Lista de Acrónimos e Símbolos</b> .....                                  | <b>xvii</b> |
| <b>1 Introdução</b> .....   | <b>1</b>    |
| <b>2 Materiais e Métodos</b> .....  | <b>7</b>    |
| 2.1 Materiais.....  | 7           |
| 2.2 Produção das Réplicas Invertidas de Cristais Coloidais .....            | 7           |
| 2.3 Processos para a otimização de parâmetros de produção dos ICC's .....   | 8           |
| 2.4 Ensaio de caracterização estrutural e mecânica e ensaios in-vitro ..... | 8           |
| <b>3 Análise e Discussão de Resultados</b> .....                            | <b>9</b>    |
| 3.1 Otimização de parâmetros .....  | 9           |
| 3.2 Caracterização estrutural e mecânica .....                              | 20          |
| 3.3 Ensaio in-vitro .....   | 24          |
| <b>4 Conclusões e Perspetivas Futuras</b> .....                             | <b>27</b>   |
| <b>Referências</b> .....  | <b>29</b>   |
| <b>Anexos</b> .....   | <b>31</b>   |
| Anexo I - Processos de produção dos ICC's.....                              | 31          |
| Anexo II - Metodologias para a seleção de parâmetros .....                  | 35          |
| Anexo III - Metodologias para a caracterização estrutural e mecânica .....  | 37          |
| Anexo IV – Metodologias dos ensaios in-vitro .....                          | 39          |



# Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 3.1 - Valores característicos das amostras de microesferas de PS analisadas por microscopia ótica. ....   | 10 |
| Tabela 3.2 - Valores dos tempos iniciais e finais de presa do cimento de brushite segundo a variação de rácio de líquido-sólido e percentagem em massa de glicerol. .... | 12 |
| Tabela 3.3 – Valores característicos dos ICC's de brushite, produzidos à base de misturas de brushite com L/S de 0.35 e glicerol a 7.5%. ....                            | 22 |
| Tabela 3.4 Valor do módulo de Young, de provetes de brushite compacta, produzidos a partir de misturas de brushite com L/S de 0.35 e glicerol a 7.5%. ....               | 22 |
| Tabela 3.5 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade aos ICC's de brushite. ....  | 24 |
| Tabela 3.6 - Viabilidade celular das sementeiras expostas a extratos de diferentes concentrações, de ICC's de brushite. ....   | 25 |
| Tabela 3.7 – Valor médio da taxa de adesão celular nos ICC's. ....   | 25 |



# Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 2.1 - Ilustração esquemática do processo de produção de réplicas invertidas de cristais coloidais à base de brushite.....   | 7  |
| Figura 3.1 - Microesferas de PS produzidas por microfluídica.....  | 9  |
| Figura 3.2 - Deformações nas esferas de PS produzidas por sistema de microfluídica.....  | 10 |
| Figura 3.3 - Cristal coloidal de microesferas de PS.....   | 11 |
| Figura 3.4 - Curvas de viscosidade do cimento de brushite em função do tempo, para diferentes teores de glicerol e rácio líquido-sólido de 0.25 ml/g.....  | 13 |
| Figura 3.5 - Curvas de viscosidade do cimento de brushite em função do tempo, para diferentes teores de glicerol e rácio líquido-sólido de 0.35 ml/g.....  | 14 |
| Figura 3.6 - a) ICC obtido a partir de misturas com L/S de 0.25, b) ICC obtido a partir de misturas com L/S de 0.35, c) ICC obtido a partir de misturas com L/S de 0.35 e glicerol a 5%.....   | 16 |
| Figura 3.7 - ICC produzido a partir de misturas com L/S de 0.25 e glicerol a 10%, a) Ampliação de 50x, b) Ampliação de 5000x.....  | 17 |
| Figura 3.8 - ICC produzido a partir de misturas com L/S de 0.25 e glicerol a 7.5%, a) Ampliação de 50x, b) Ampliação de 5000x.....   | 17 |
| Figura 3.9 - ICC produzidos a partir de misturas com L/S de 0.25 e glicerol a 7.5%, a) Ampliação de 50x, b) Ampliação de 5000x.....  | 18 |
| Figura 3.10 - ICC produzido a partir de misturas com L/S de 0.35 e glicerol a 10%, a) Ampliação de 50x, b) Ampliação de 5000x; ICC produzido a partir de misturas com L/S de 0.35 e glicerol a 7.5%, c) Ampliação de 50x, d) Ampliação de 5000x..... | 19 |
| Figura 3.11 - Difractograma de DRX da amostra de brushite após maturação completa do cimento.....  | 20 |
| Figura 3.12 - Curva representativa de tensão vs. extensão para os ICC's de brushite....  | 21 |
| Figura 3.13 - Taxa de proliferação celular dos ICC's de brushite, em comparação com o controlo, durante um período de 13 dias.....   | 26 |



# Lista de Acrónimos e Símbolos

ICC – Réplica Invertida de Cristal Coloidal

CPC – Cimento de Fosfato de Cálcio

DCPD – Fosfato Di-Cálcio Di-hidratado

$\beta$ -TCP –  $\beta$  Fosfato Tricálcico

MCPM – Fosfato monocálcico mono-hidratado

L/S – Rácio líquido-sólido

HAp – Hidroxiapatite

CC – Cristal Coloidal

PVA – Polivinil Álcool

PS – Poliestireno

DRX – Difração de raios-X

Rpm – Rotações por minuto

p/p – Percentagem em massa

SEM – Microscopia Eletrónica de Varrimento (Scanning Electron Microscope)

C+ – Controlo positivo

C- – Controlo negativo

C<sub>0</sub> – Concentração inicial



# 1 Introdução

A viragem de século propulsionou uma maré crescente no investimento e interesse dos grupos científicos e de investigação, direccionados à Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa, agora que a ideia de recuperar tecidos lesados deixou de ser do domínio exclusivo dos argumentos de ficção científica, mas sim cada vez mais uma realidade atual.

Esta dissertação direciona o seu foco à regeneração de tecido ósseo. A fim de viabilizar este objectivo, serão estudados *scaffolds* produzidos a partir de réplicas invertidas de cristais coloidais (ICC, do inglês *Inverted Colloidal Crystals*) à base de cimentos de brushite.

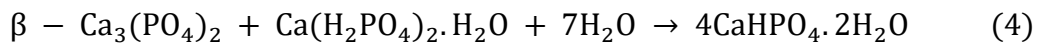
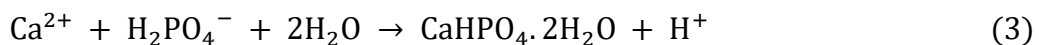
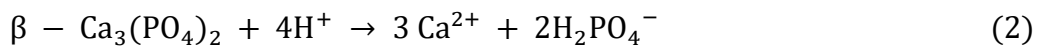
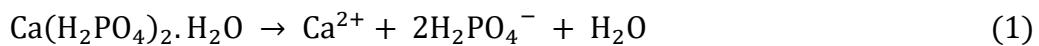
O uso de enxertos é o procedimento base no tratamento de tecidos ósseos lesados. Estima-se que são executados cerca de 500.000 procedimentos de enxertos ósseos, anualmente, apenas nos Estados Unidos, e movem um volume de negócio de cerca de 2.500 milhões de dólares. Clinicamente, o processo mais explorado, é o recurso a autoenxertos (58% dos casos). Porém este método tem limitações e consequências óbvias, tais como, a limitação na quantidade de tecido ósseo que pode ser recolhido do próprio, a sua morbilidade, bem como a necessidade de intervenções clínicas complementares, que irão estender o período de recuperação do paciente. A segunda hipótese passa pela utilização de enxertos de doadores (34% dos casos), mas também este procedimento sofre de limitações importantes, como a disponibilidade de doadores, a transmissão de doenças, e mais importante, o risco de rejeição. [1] – [3]

Devido a estas limitações, atualmente existe uma grande procura de materiais sintéticos “*bone-like*” [2]. Para isso é necessária a utilização de biomateriais, devido às suas propriedades intrínsecas de biocompatibilidade, biodegradação e, sobretudo para este processo, a sua bioatividade, que funcionem também como elemento estrutural. Os cimentos de fosfato cálcico (*calcium phosphate cements*, CPC), são uma família de bio-cerâmicos que têm ganho a aprovação da comunidade científica e médica para utilização como material base de *scaffolds* para enxertos ósseos. Isto deve-se à similaridade química destes com a componente mineral do osso. Os CPC, mais do que as características inerentes dos biomateriais, possuem ainda a seu favor os baixos custos das matérias-primas, fácil disponibilidade, mas acima de tudo, propriedades osteocondutoras e

osteointodutoras, que fazem desta família de materiais a solução mais favorável como material base de enxertos ósseos [3].

Dentro da família dos CPC a brushite destaca-se como material de interesse para a aplicação em regeneração óssea. Esta é favorecida devido à sua taxa de absorção superior, *in-vivo*, comparativamente à hidroxiapatite (HAp), outro material de excelência em aplicações biomédicas, da mesma família de CPC. Estudos *in-vivo* demonstraram que a hidroxiapatite permite a criação de uma região superficial de ligação com o osso, enquanto que para a brushite verifica-se a presença de uma interface de cerca de 400 µm, entre o material e o osso, resultante da reabsorção da brushite em sincronia com o crescimento de osso novo [4], [5]. Azama et al. [2] no seu estudo, foi mais longe na busca de métodos para aumentar a bioactividade brushite, através da dopagem de iões de magnésio, no cimento de brushite, que afirma ter resultado no aumento da proliferação de osteoblastos, e conseqüentemente, no incremento da formação de novo osso. A brushite foi descoberta por Mirtchi e Lemaître em 1989, é também conhecida como fosfato di-cálcico di-hidratado (*dicalcium phosphate dihydrate, DCPD*) e é um mineral ósseo de rácio Ca/P unitário e composição  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , que possui uma forma desidratada designada de monetite ( $\text{CaHPO}_4$ ).

O método de produção da brushite passa pela mistura mecânica de uma fase sólida e uma fase aquosa, de pH inferior a 4,2 uma vez que para meios mais básicos se induz a formação de HAp [5], [6]. A fase sólida é comumente constituída por uma mistura de CPC's, neste caso um sistema equimolar de  $\beta$ -TCP ( *$\beta$ -tricalcium phosphate*) e MCPM (*monocalcium phosphate monohydrate*) que é posteriormente adicionada à fase aquosa. Abaixo está descrita a reação química, que resulta na formação da brushite, onde a equação 4 representa a reação global e pode ser decomposta nas equações 1, 2, 3.



A reação entre as duas fases é exotérmica e leva à formação de um cimento, cujo período de endurecimento é extremamente curto, normalmente no intervalo dos 30 – 60s. A fase aquosa pode ser constituída apenas por água, mas na maioria dos casos, trata-se de uma solução de sais retardantes, comumente pirofosfatos de cálcio, pirofosfatos de sódio ou ácido pirofosfórico. A adição dos sais promove a retardação do crescimento dos grãos cristalinos, que permite um maior fator de empacotamento dos cristais do cimento, que de outra forma seria diminuta, devido à velocidade de endurecimento.

Por outro lado, também induz grão de menor tamanho, o que em conjunto com o maior empacotamento cristalino leva ao incremento das propriedades mecânicas do cimento [4] – [9]. Outro fator a controlar é a razão entre a fase sólida e a fase aquosa. Uma vez que a água da mistura é incorporada na estrutura da brushite, a quantidade fornecida à reação torna-se revelante, e nunca deve ser um reagente limitante, embora a variação das razões de líquido-sólido (L/S) influenciem as propriedades mecânicas dos cimentos resultantes [9].

No meio clínico, os cimentos de brushite são normalmente produzidos *in-situ*, e usados como cimentos injetáveis, utilizados, sobretudo no preenchimento de fendas ou defeitos ósseos, normalmente da região facial ou outras áreas que não sofram intensa solicitação mecânica, devido às fracas propriedades mecânicas dos cimentos. Porém, em certas situações, o tempo de endurecimento é uma limitação que impede a utilização deste método por parte dos cirurgiões *in-situ* [5], [8]. Existem alguns tempos característicos do endurecimento do cimento que, clinicamente, podem servir como parâmetros que avaliam a viabilidade da aplicação do cimento *in-situ*. O tempo de início de presa representa o intervalo entre o momento em que a mistura do cimento é realizada e o cimento apresenta características de maneabilidade sem aderência, o que fisicamente representa o aumento da viscosidade. Clinicamente procura-se que este tempo se adeque à extensão do procedimento cirúrgico, de forma a não comprometer o seu escoamento no interior da seringa e através da agulha. É durante este intervalo que o cimento apresenta as condições ótimas para ser trabalhado pelo clínico. Contudo existe outro tempo relacionado com o comportamento do cimento *in-vivo*, denomina-se de tempo que coesão e representa o tempo necessário para que o cimento adquira a propriedades mecânicas e químicas para que não se desintegre quando exposto a meios aquosos, tais como os existentes no organismo humano. Para a manipulação do cimento deve existir uma janela de oportunidade de no mínimo 1 minuto entre o início do tempo de coesão e o tempo inicial de presa, para que o clínico possa aplicar e moldar o cimento sem que este se degrade ou obstrua a seringa. Finalmente segue-se o tempo final de presa que representa o tempo necessário ao cimento para obter as propriedades que lhe permitam resistir a uma determinada tensão. Em termos clínicos este tempo representa o momento em que a incisão pode ser fechada, e procura-se que este não se estenda mais que o estritamente necessário. Para este fim de utilização, o recurso a retardantes e o estudo da influência que estes têm nos tempos característicos de cada sistema de cimento específico, apresenta-se como um fator de suma importância [10]. Contudo esta dissertação visa a utilização dos cimentos de brushite na produção de *scaffolds* tridimensionais, a partir de ICC's, que como será explanado, excluí muitas das limitações do método de preparação e aplicação *in-situ*.

Os ICC's representam uma nova forma de *scaffold* tridimensional, usados em procedimentos de culturas celulares, onde funcionam como suporte estrutural e biológico do crescimento celular. Os *scaffolds* tridimensionais possuem a vantagem de disponibilizar maiores áreas superficiais necessárias para os processos de adesão e proliferação celular. Porém, o que destaca este novo tipo de estrutura é o seu elevado nível de organização, que é preservada em dimensões significativas. Estas estruturas altamente organizadas e interconectadas favorecem os processos de migração celular, aliado à simplicidade das técnicas de produção. Além disso, esta técnica permite um controlo alargado de importantes parâmetros do *scaffold*, tais como a dimensão dos poros conectores dos alvéolos, assim como a própria dimensão destes, resultando numa elevada reprodutibilidade do processo. O controlo destes parâmetros permite um melhorado processo de otimização das interações célula-célula e célula-*scaffold* [11] – [15].

O primeiro passo da produção do ICC passa pela produção das microesferas poliméricas. Kotov *et al.* [16], [17] recorre a microesferas de poliestireno para a produção do cristal coloidal (CC), enquanto que Lee *et al.* [13] utiliza a poliacrilamida. A dimensão dos alvéolos pode ser diretamente controlada pela dimensão das esferas, mas para o fim de cultura celular estas apresentam habitualmente dimensões de poucas centenas de micrómetros. Os métodos de produção das microesferas poliméricas são variados, de onde se destacam: emulsão, separação de fases, “*spray drying*” e sol-gel. A promoção da auto-organização destas também pode ser alcançada por meio de vários procedimentos que muitas vezes estão relacionados ao método de produção e dos quais se destacam: sedimentação, centrifugação, evaporação controlada, deposição em molde e eletroforese [11]. As microesferas dispõem-se no arranjo de menor energia, e desta forma organizam-se numa estrutura hexagonal compacta. Nesta estrutura cada microesfera encontra-se em contacto direto com doze outras microesferas. É este empacotamento que proporciona aos ICC's uma estrutura altamente interconectada [11], [12], [15]. A estrutura resultante, como referido anteriormente, denomina-se de CC.

Através de um processo de recozimento é promovida a coesão da estrutura do CC. Porém este passo tem maiores propósitos do que apenas incrementar a coesão mecânica da estrutura. É nesta fase que é definida a dimensão dos poros conectores do ICC. A dimensão dos poros possui forte influência na migração celular e do transporte de nutrientes no interior do *scaffold*. Atingir as condições ideais para estes comportamentos ainda é o ponto fraco de muitas outras técnicas de produção de *scaffolds*. Porém as técnicas de produção do CC permitem um controlo bastante alargado da dimensão dos poros, através do controlo da temperatura e tempo de recozimento [11], [13], [17].

Uma vez obtida a estrutura final do CC, são apenas necessários os passos de impregnação do biomaterial e remoção das microesferas para a obtenção do ICC [11]. O processo de impregnação passa somente pelo preenchimento dos espaços vazios entre as microesferas, no caso deste estudo, pelo cimento de brushite. É neste passo que as características de produção de cimentos de brushite e a enformação de ICC's se combinam de forma favorável. O cimento de brushite sofre um endurecimento rápido e autónomo, não tornando necessário procedimento complementar. Assim os curtos tempos de endurecimento do cimento de brushite, transfiguram-se em vantagens quando aplicados ao processo de produção de ICC's. Ao contrário de todas as restrições que se observam para a aplicação direta do cimento de brushite *in-situ*, muitas perdem significado quando transposta para a produção de ICC's. Uma vez que o ICC só é aplicado *in-vivo* após se encontrar totalmente solidificado. Tendo isto em conta, o único requisito que é necessário providenciar é que, desde o momento que a mistura é executada e até ao fim do tempo de presa, seja realizada por completo a impregnação da estrutura de CC. Após o endurecimento do cimento de brushite as microesferas são finalmente removidas por dissolução em solvente ou por degradação térmica do polímero, após o qual o ICC fica pronto. Além de altamente conectada, os ICC's usufruem de uma microestruturação, que permite o estudo sistemático de estudos celulares *in-vitro*, referentes ao transporte de nutrientes e metabolitos, absorção e adsorção de nutrientes, interações célula-célula e célula-matriz, entre outros. Desta forma é possível estudar respostas celulares aos *scaffolds* de forma significativa e quantitativa [14].

Considerando o conjunto das características dos dois processos, pode se concluir que a conjugação das duas técnicas se apresenta como uma solução promissora, para a produção de um *scaffold* para a regeneração óssea. As espumas à base de cimento de brushite com estrutura de ICC's fornecem um *scaffold* tridimensional, que apresentam uma elevada área superficial, mas que são principalmente inovadores no nível de organização e interconectividade que disponibilizam, e que utilizam a brushite como elemento osteoindutor e osteocondutor que se coaduna com os tempos de formação de osso novo.



## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

O processo de produção das microesferas foi realizado por recurso a métodos de microfluídica, no qual é usado polivinil álcool (PVA,  $M_w = 95,000$ , Acros Organics, 95%) como componente da fase contínua e poliestireno (PS,  $M_w = 350,000$ , Aldrich), em diclorometano (Sigma-Aldrich,  $\geq 99,9\%$ ), como componente da fase descontínua.

Na produção do cimento, são usados o MCPM (Sigma-Aldrich,  $\geq 85\%$ ) e  $\beta$ -TCP (Sigma-Aldrich,  $\geq 96\%$ ) como precursores de Brushite. Além destes, pirofosfato de sódio (*sodium pyrophosphate*, SPP) (Sigma-Aldrich), ácido cítrico (Sigma-Aldrich, 99%) e ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich, 95-97%) são usados como retardantes da reação. O glicerol (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ) foi adicionado para reduzir a viscosidade [19].

### 2.2 Produção das Réplicas Invertidas de Cristais Coloidais

O processo de produção dos ICC's de brushite pode ser resumido, pelo os seguintes passos, ilustrados abaixo:

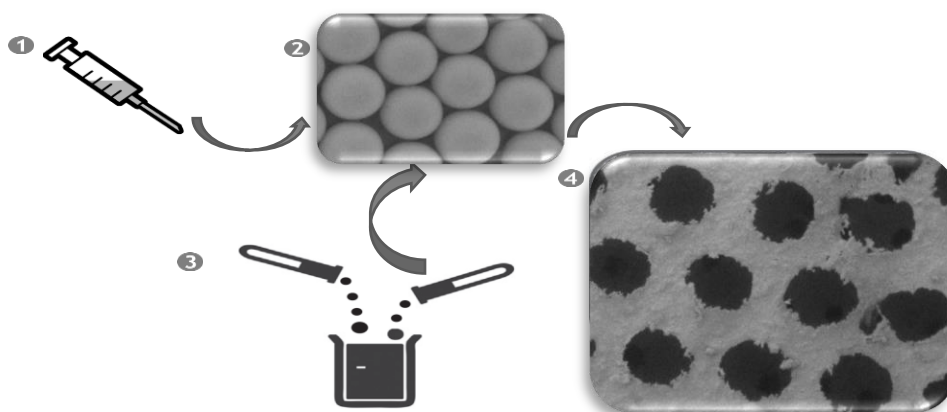


Figura 2.1 - 1) Produção das microesferas; 2) Enformação da estrutura do CC; 3) Impregnação dos CC com cimento de brushite; 4) ICC de brushite, adaptado de João et. al [18].

Em suma o processo de produção pode ser dividido em 3 etapas. Primeiro, as esferas são produzidas num sistema de microfluídica, de seguida é promovida a enformação destas em estruturas de CC's, e por fim estes são impregnados pelo cimento de brushite, resultando na obtenção dos ICC's de brushite após a remoção das microesferas. Os detalhes sobre os procedimentos aplicados encontram-se no anexo I.

## **2.3 Processos para a otimização de parâmetros de produção dos ICC's**

A fim de determinar os parâmetros ótimos para a produção de ICC's de brushite, um conjunto de ensaios foi realizado. Começou-se pela inspeção das microesferas de PS obtidas sob microscopia ótica, de forma a avaliar as dimensões e morfologia destas. Os seguintes ensaios visam a determinação das características do endurecimento do cimento, de forma a avaliar quais parâmetros oferecem as melhores condições para a impregnação dos ICC's. Para isso foram realizados ensaios em composições de cimentos dos quais foram variados valores dos parâmetros de rácio líquido-sólido e percentagem de glicerol. Foi retirado os tempos de presa característicos de cada amostra. De seguida um ensaio reológico, onde foram retirados valores de viscosidade dos cimentos em função do tempo. Por fim a avaliação da morfologia dos ICC's através de SEM. Os detalhes das metodologias usadas encontram-se no anexo II.

## **2.4 Ensaios de caracterização estrutural e mecânica e ensaios in-vitro**

Após selecionado o conjunto de parâmetros ótimos, amostras produzidas segundo este foram sujeitas a diversos ensaios de caracterização. O objetivo é a análise das propriedades intrínsecas destas, de forma a avaliar se estas se ajustam aos requisitos exigidos pelas suas aplicações. Foram analisadas as fases cristalográficas presentes através de difração de raios-X. Procedeu-se também a ensaios de compressão mecânica para avaliar a propriedades mecânicas destes. E finalmente, foram executados ensaios de citotoxicidade. Os detalhes das metodologias usadas encontram-se anexo III e anexo IV.

## 3 Análise e Discussão de Resultados

### 3.1 Otimização de parâmetros

#### 3.1.1 Morfologia e dimensão das microesferas de poliestireno

A morfologia e a dimensão das microesferas de PS são características fundamentais na produção de CC's viáveis, e consequentemente ICC's. As esferas de PS devem apresentar uma forma esférica e uma pequena dispersão de diâmetros. Apenas esferas possibilitam a produção de arranjos cristalográficos sem defeitos, neste caso concreto, uma estrutura hexagonal compacta. Por outro lado, também a dimensão das esferas deve possuir o menor desvio possível. Isso porque esferas deformadas ou de tamanhos dispersos promovem defeitos no arranjo, tais como a inexistência de pontos de contacto entre esferas vizinhas. A dimensão das esferas também é diretamente responsável pela adequabilidade dos ICC's para a aplicação como *scaffolds* para a regeneração, na qual as cavidades deixadas por estas no ICC's devem possuir um tamanho adequado à infiltração por osteoblastos. Para isso os parâmetros do sistema de produção das esferas foram seleccionados visando a obtenção de esferas de dimensões de aproximadamente 320  $\mu\text{m}$ . Os parâmetros usados estão descritos no anexo I. A seleção de parâmetros foi aliçada no estudo reportado por João et. al [18].

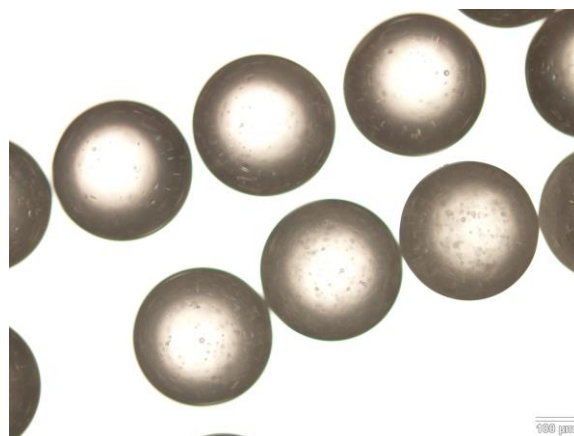


Figura 3.1 - Microesferas de PS produzidas por microfluídica.

Para avaliar estas características, diferentes amostras de esferas foram recolhidas e observadas sob microscopia ótica. Dos dados recolhidos foi possível avaliar a forma das esferas, mas sobretudo retirar dimensões usadas no cálculo do tamanho médio e do desvio padrão.

| Média [ $\mu\text{m}$ ] | Desvio Padrão [ $\mu\text{m}$ ] | Variação [%] |
|-------------------------|---------------------------------|--------------|
| 342                     | 6                               | 1.8          |

Tabela 3.1 - Valores característicos das amostras de microesferas de PS analisadas por microscopia ótica.

Portanto as esferas obtidas possuem dimensões de  $(342 \pm 6) \mu\text{m}$ . Isso representa um desvio de cerca de 6% do valor alvo, porém não compromete a viabilidade das amostras. Além disso verifica-se uma variação de 1.8% o que representa um valor para o qual é aceitável considerar a amostra monodispersa.

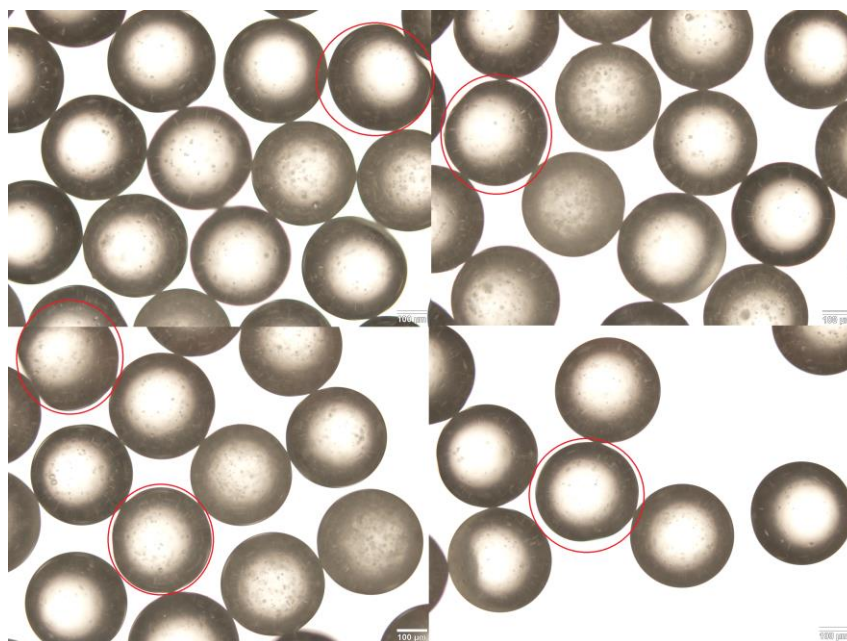


Figura 3.2 - Deformações nas esferas de PS produzidas por sistema de microfluídica.

Em termos da morfologia das esferas de PS, foi possível observar pontualmente esferas deformadas, com um ligeiro achatamento. Dado que a quantidade de esferas que apresentavam este defeito foi diminuta, não se verificou qualquer influência na organização da estrutura final.

Pôde-se verificar, numa análise posterior por SEM, que as esferas se empacotaram, no CC, numa estrutura hexagonal compacta. Porém, encontram-se destacados na imagem alguns defeitos pontuais resultantes de ausência de contacto de uma esfera com a totalidade das esferas vizinhas, provocado maioritariamente por oscilações nos diâmetros das esferas. Assim como a presença de lacunas, consequentes da incapacidade desta de alojar uma esfera de dimensões médias, sendo uma vez mais resultado das variações nos tamanhos das esferas. Contudo, efeitos deste tipo são difíceis de evitar mesmo após peneiração das esferas produzidas.

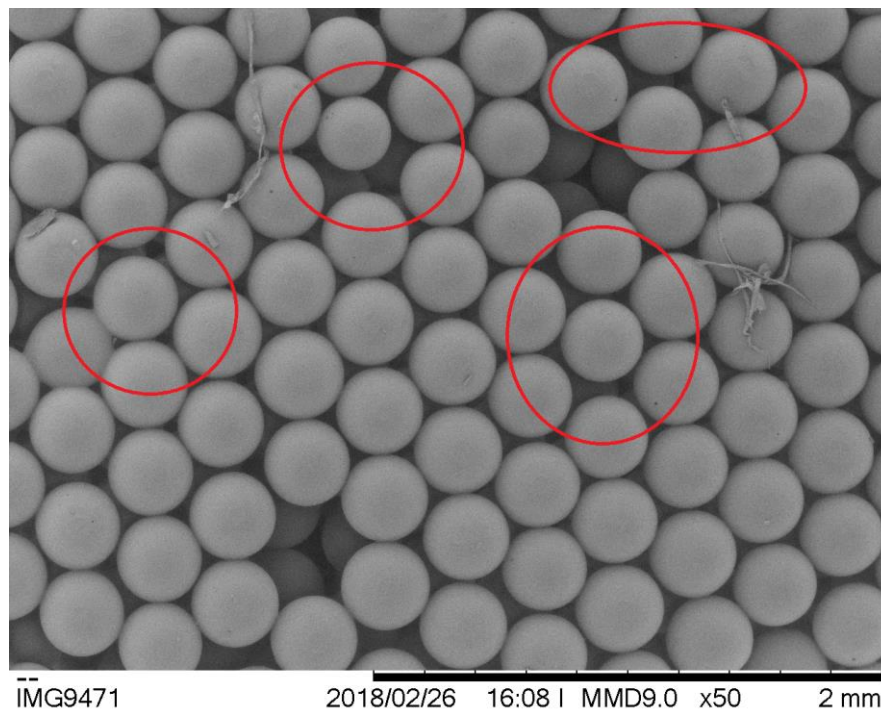


Figura 3.3 - Cristal coloidal de microesferas de PS.

### 3.1.2 Tempo de presa

A avaliação do tempo de presa é um fator essencial para o sucesso da produção de ICC's. O processo de impregnação do cimento de brushite no CC exige que o cimento ofereça uma janela de oportunidade que se coadune com a extensão temporal do processo. Desta forma estas medidas foram concebidas com o propósito de explorar quais dos parâmetros inicialmente propostos, demonstram oferecer condições compatíveis com o processo de produção de ICC's.

Foram determinados os tempos de presa, inicial e final, para cimentos de brushite nos quais e variou a razão líquido/sólido (L/S) e a percentagem em massa de glicerol.

Cada parâmetro possuía 10 réplicas das quais se realizou a média para a obtenção dos valores finais.

| L/S (ml/g)                 | 0.25 |     |     |     | 0.35 |     |     |     |
|----------------------------|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Glicerol (%)               | 0    | 5   | 7,5 | 10  | 0    | 5   | 7,5 | 10  |
| Tempo inicial de presa [h] | 1    | 3   | 6   | 10  | 2    | 3   | 5   | 6   |
| Desvio padrão, $T_i$ [h]   | 0.1  | 0.1 | 0.4 | 0.8 | 0.2  | 0.1 | 0.3 | 0.4 |
| Tempo final de presa [h]   | 2    | 5   | 8   | 17  | 2.3  | 4   | 6   | 7   |
| Desvio padrão, $T_f$ [h]   | 0.1  | 0.3 | 0.5 | 1.5 | 0.2  | 0.3 | 0.4 | 0.5 |

Tabela 3.2 - Valores dos tempos iniciais e finais de presa do cimento de brushite segundo a variação de rácio de líquido-sólido e percentagem em massa de glicerol.

Pelos valores da tabela 3.2, os cimentos produzidos com preparações de L/S de 0.25 e 0.35 sem adição de glicerol, assim como o cimento preparado com 5% de glicerol e L/S de 0.35, não possuem tempo de presa suficiente para possibilitar uma impregnação bem-sucedida dos CC's. Esta afirmação é compactuada pelos resultados observados no capítulo 3.1.4. Por outro lado, para a amostra de L/S de 0.35, com glicerol a 10%, os tempos de presa apresentados são demasiado extensos, para que possam ser usados sob uma rotina laboratorial. Assim, apenas as restantes formulações foram usadas na produção dos ICC's. Pode-se ainda observar pelo conjunto dos resultados, à exceção do cimento de L/S = 0.25 sem glicerol, que as amostras de L/S de 0.35 possuem tempos de presa inicial e final, mais curtos e menos espaçados, que as de L/S de 0.25. Além disso, verifica-se ainda que, a concentração de glicerol influencia fortemente o tempo de presa. Os resultados validados nesta análise serão confrontados com os restantes estudos no capítulo 3.1.4 de forma a estabelecer os parâmetros ótimos na produção de ICC's.

### 3.1.3 Análise Reológica

Os ensaios reológicos foram realizados de forma a complementar os meios de determinação da janela de oportunidade durante a qual é possível a impregnação dos ICC's.

Para isso foram retirados valores de viscosidade, espaçados temporalmente, dos cimentos de brushite cujos parâmetros promovem tempos de presa validados anteriormente. A viscosidade foi medida, imediatamente após preparação das misturas L/S e posteriormente em intervalos de tempo adequados, para três amostras de cada composição das quais foi retirada uma média. Esses valores foram compilados de forma a se obter a evolução da viscosidade de cada amostra ao longo do tempo. Pretende-se então, com base nos valores estruturados, determinar não só as características do endurecimento do cimento, mas também delimitar a janela de oportunidade para o processo de impregnação do cimento de brushite nos ICC's, para cada amostra. Em conjunto com os restantes estudos, será avaliado no capítulo 3.1.4, os tempos para a janela de oportunidade que permitem a obtenção de ICC's estruturalmente funcionais. Nas figuras 3.4 e 3.5 apresenta-se a evolução temporal da viscosidade das amostras estudadas.

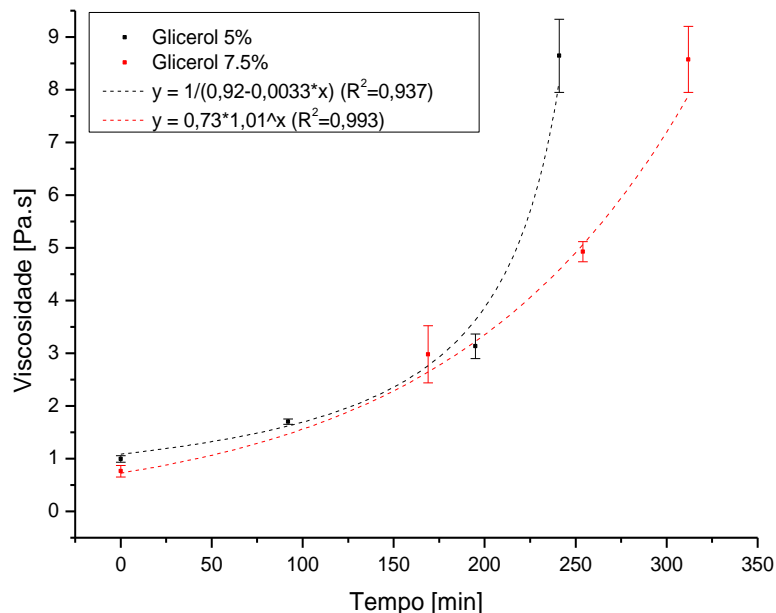


Figura 3.4 - Curvas de viscosidade do cimento de brushite em função do tempo, para diferentes teores de glicerol e rácio líquido-sólido de 0.25 ml/g.

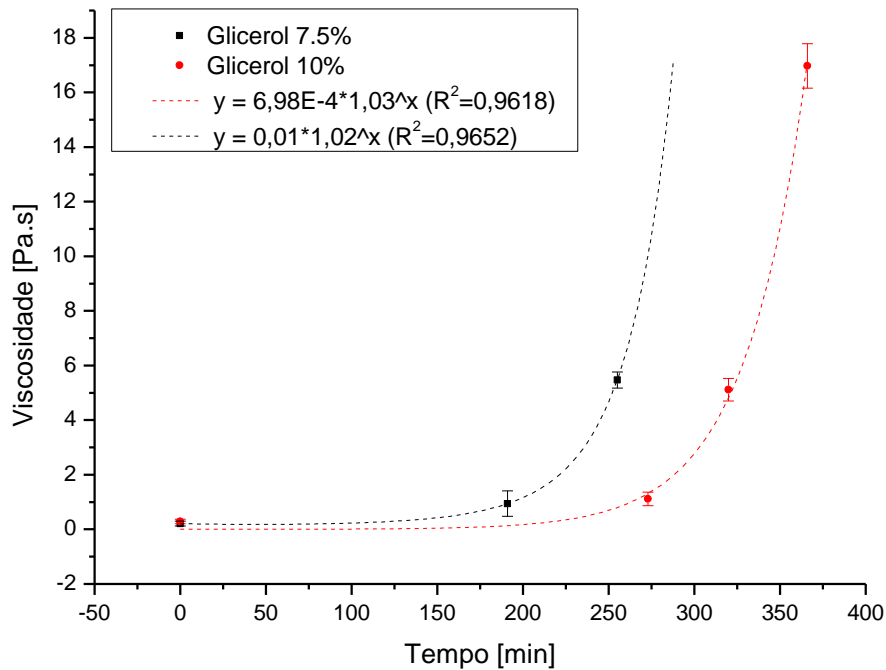


Figura 3.5 - Curvas de viscosidade do cimento de brushite em função do tempo, para diferentes teores de glicerol e rácio líquido-sólido de 0.35 ml/g.

Do conjunto das curvas da fig. 3.4 e 3.5 pode-se aferir que diferentes concentrações de glicerol, não promovem variações significativas nas viscosidades iniciais. A variação da viscosidade ao longo do tempo apresenta um comportamento aproximadamente exponencial. Esse comportamento é mais acentuado nas amostras de L/S de 0.35 ml/g, em comparação para as amostras de rácio de 0.25 ml/g, o que vai de encontro ao observado nos ensaios de tempo de presa, onde o intervalo entre o tempo de presa inicial e o tempo de presa final é mais curto.

As curvas possuem duas secções aproximadamente lineares, separadas por uma região de transição. Dentro do âmbito da primeira secção linear pode-se observar uma diferença significativa, entre o comportamento das viscosidades das amostras de L/S de 0.35 e 0.25. Nas amostras de 0.35 observa-se para a secção linear inicial, um declive próximo de zero, o que resulta em variações mínimas dos valores de viscosidade ao longo desta, mantendo-se estes próximos dos valores iniciais. Contudo nas amostras de L/S de 0.25 verifica-se um crescimento contínuo da viscosidade, mesmo nas fases iniciais do endurecimento do cimento. Cruzando os valores dos tempos de presa inicial, no-

meadamente das amostras de L/S de 0.25 com glicerol a 5% e 7.5% e as amostras de L/S de 0.35 com glicerol a 7.5% e 10%, sendo estes respetivamente 210, 360, 270, 330 minutos, com as curvas de viscosidade em função do tempo, verifica-se que estes se sobrepõem ao início da segunda secção linear. Esta correlação é mais evidente nas amostras de L/S de 0.35, uma vez que, e como foi referido acima, possuem um comportamento mais delineado. É possível ainda concluir que, o aumento do teor de glicerol retarda o surgimento do tempo inicial de presa.

A impregnação dos ICC's é apenas possível durante a primeira região linear. Desta forma, a extensão desta está diretamente associada à janela de oportunidade para a impregnação. Porém a remoção dos CC's do cimento de brushite, só deve ser realizada já entre os tempos de presa inicial e final, para possibilitar a densificação do cimento nos interstícios dos CC's. Resumindo, é do interesse do processo que, a viscosidade se mantenha o mais baixo possível durante a primeira secção linear, que esta possua uma extensão ótima, e que após terminada, decorra o menor tempo possível até este entrar nos domínios do tempo de presa. Pode-se então concluir que, segundo estes critérios, apenas as amostras com L/S de 0.35 se enquadram melhor às exigências do processo. Estas conclusões serão aplicadas em conjunto com os resultados do capítulo 3.1.4, para a seleção dos parâmetros ótimos.

#### 3.1.4 Análise da morfologia dos ICC's

O método mais direto e claro de avaliar o impacto dos parâmetros propostos sobre a estrutura dos ICC's produzidos, é por análise da sua morfologia. Desta forma amostras de cada parâmetro foram analisadas por SEM (Hitachi, TM4000Plus), e não só a amostras validadas anteriormente. Procura-se com isso, confirmar e validar as conclusões propostas ao longo dos dois ensaios antecedentes.

Para cada amostra foram retiradas imagens com ampliações de 50x e 5000x, para que em cada fosse possível avaliar a morfologia da estrutura, assim como a qualidade do processo de densificação das paredes de brushite promovido pelos parâmetros específicos, respetivamente. Foram produzidas para cada parâmetro 3 ICC's, de forma a avaliar a reprodutibilidade do processo. Contudo, serão apenas apresentadas as imagens que melhor representam as características observadas no conjunto destas. Tendo sido definidos os métodos e objetivos do ensaio, primeiramente, serão alvo de foco as amostras cujo os parâmetros foram invalidados pelos experimentos anteriores.

As amostras produzidas a partir de misturas com L/S de 0.25 e 0.35 sem adição de glicerol, e L/S de 0.35 e glicerol a 5%, foram descartadas como opções viáveis devido a tempos de presa demasiado curtos, e consequentemente, janelas de oportunidade incapazes de permitir a correta impregnação dos ICC's.

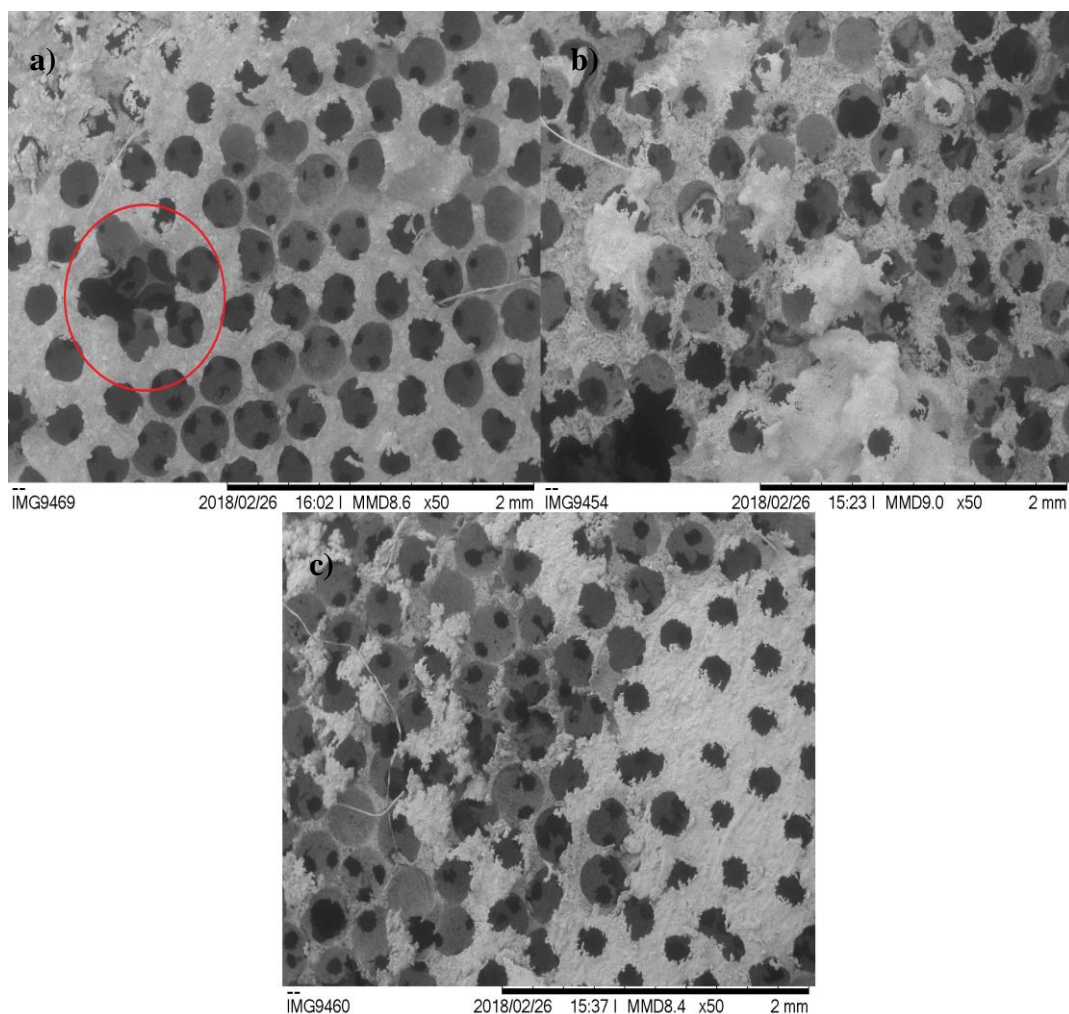


Figura 3.6 - a) ICC obtido a partir de misturas com L/S de 0.25, b) ICC obtido a partir de misturas com L/S de 0.35, c) ICC obtido a partir de misturas com L/S de 0.35 e glicérol a 5%.

Na figura 3.6, pode-se verificar claramente que, para as amostras produzidas a partir de misturas com L/S de 0.35 sem e com glicérol a 5%, conduzem à formação de ICC's com estruturas defeituosas e ocas. Contudo, na figura 3.6.a pode-se verificar que a estrutura do ICC produzido a partir de misturas com L/S de 0.25 possui deficiente preenchimento e como assinalado, também este é oco.

Por motivos contrários, as misturas com L/S de 0.25 e glicérol a 10%, não permitiriam a obtenção de ICC's funcionais, uma vez que os tempos de presa demasiados extensos não permitiriam um correto processo de impregnação segundo uma rotina laboratorial.

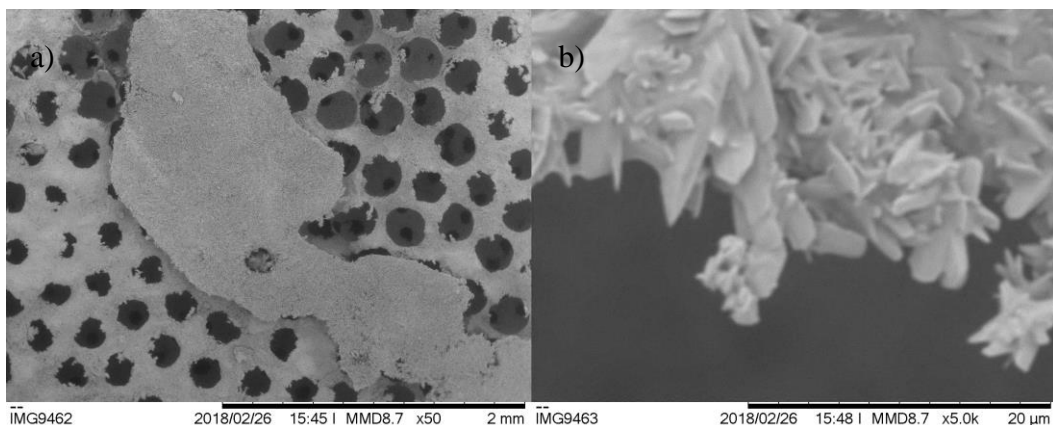


Figura 3.7 - ICC produzido a partir de misturas com L/S de 0.25 e glicerol a 10%, a) Ampliação de 50x, b) Ampliação de 5000x.

Na figura 3.7.a, a superfície lisa sobre o ICC trata-se da estrutura resultante do escoamento do cimento dos interstícios do CC's para o recipiente onde este foi armazenado após a sua remoção deste. Isto sucede porque, contrariando o afirmado no capítulo 3.1.3, esta amostra não foi retirada do cimento quando este já se encontra no domínio do tempo de presa. Por consequência da extensão do tempo de presa para esta amostra, o procedimento proposto torna-se impraticável. Além disso na figura 3.7.b, observa-se a presença de uma estrutura pouco densificada, composta por largas placas.

Passaremos agora à análise das amostras cujos parâmetros foram validados com viáveis pelas análises anteriores.

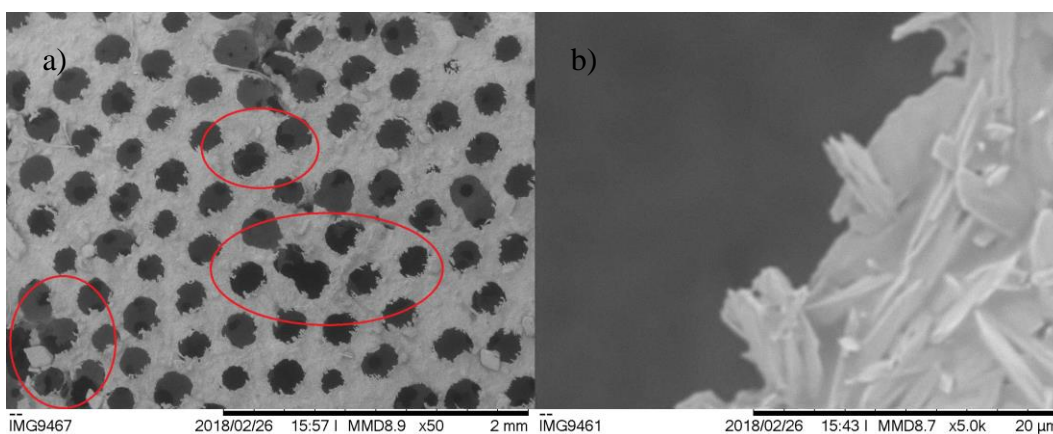


Figura 3.8 - ICC produzido a partir de misturas com L/S de 0.25 e glicerol a 7.5%, a) Ampliação de 50x, b) Ampliação de 5000x.

Para a amostra produzida a partir de misturas com L/S de 0.25 e glicerol a 7.5%, na figura 3.8, verifica-se que as paredes do ICC possuem uma densificação aceitável. Porém está sinalizado na figura 3.8.a sinais de preenchimento defeituoso e estrutura oca. Concluindo-se, ao contrário do inicialmente proposto, que a janela de oportunidade para a impregnação dos CC's, no caso deste parâmetro se apresenta como insuficiente. Esta pode-se dever a: i) o tempo de presa, e conseqüentemente a janela de oportunidade, não proporcionam o tempo suficiente para a completa impregnação da estrutura; ii) o incremento da viscosidade na etapa inicial do endurecimento do cimento, observado para estas amostras, no capítulo 3.1.3, encurtam a janela de oportunidade para tempos demasiado curtos.

A este ponto, a seleção de parâmetros encontra-se resumida às amostras produzidas a partir de misturas com L/S de 0.35 para glicerol a 7.5% e 10%, e L/S de 0.25 e glicerol 7.5%.

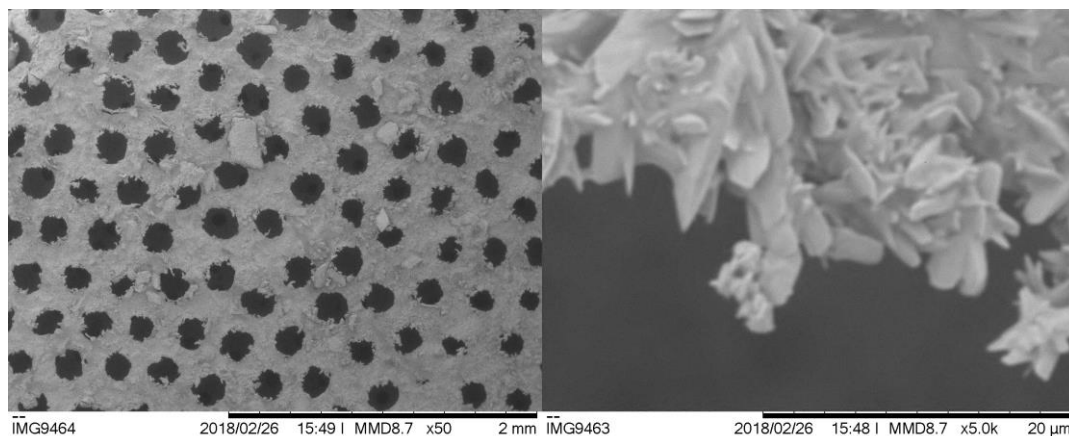


Figura 3.9 - ICC produzidos a partir de misturas com L/S de 0.25 e glicerol a 7.5%, a) Ampliação de 50x, b) Ampliação de 5000x.

Como observado na figura 3.9, a amostra produzida a partir de misturas com L/S de 0.25 e 7.5% apresenta uma estrutura bem-concebida. Porém, esta apresenta uma densificação inferior das paredes, em comparação com as amostras de L/S de 0.35. Além deste critério, e como foi observado nos ensaios anteriores, as amostras produzidas a partir de misturas com L/S de 0.35 apresentam características que melhor se enquadram as exigências do processo. Neste caso, esta amostra apresenta tempo de presa mais extensos e viscosidade crescente durante a fase de impregnação.

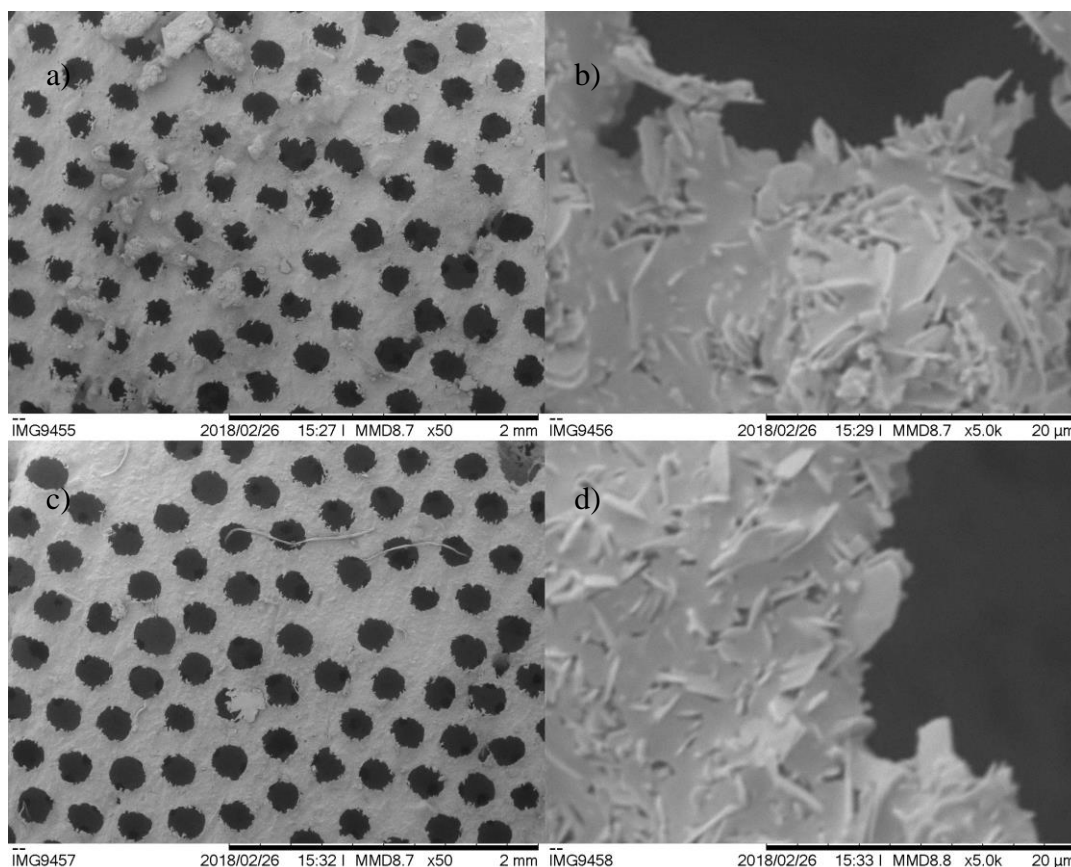


Figura 3.10 - ICC produzido a partir de misturas com L/S de 0.35 e glicerol a 10%, a) Ampliação de 50x, b) Ampliação de 5000x; ICC produzido a partir de misturas com L/S de 0.35 e glicerol a 7.5%, c) Ampliação de 50x, d) Ampliação de 5000x.

Verifica-se para ambas as amostras que os ICC's se encontram bem concebidos. Isso demonstra que a janela de oportunidade para ambas as amostras se encontra dentro da região ótima. Pelos os critérios definidos no capítulo 3.1.3, estipula-se que entre as 3 e as 4 horas e meia, representa a extensão ideal para o tempo de impregnação.

Contudo, comparando as paredes das células dos ICC's, pode-se observar uma maior presença de estruturas semelhantes a agulhas na amostra de glicerol a 10%, representando uma menor densificação destas. Na literatura é reportado que a presença de glicerol em teores superiores a 7% pode perturbar a densificação da brushite (cuja presença se confirmou por análise de DRX, apresentada seguidamente) [19]. Conclui-se que, a amostra de L/S de 0.35 e glicerol a 7.5% apresenta características que coadunam com as exigências do processo de produção, e promove a produção de ICC's com estruturas bem concebidas e paredes com uma densificação superior.

## 3.2 Caracterização estrutural e mecânica

Neste capítulo, serão sujeitas a caracterização os ICC's produzidos segundo o procedimento selecionado no capítulo anterior.

### 3.2.1 Caracterização estrutural dos ICC's

Para as análises de difração de raios-X (DRX) foram usadas pastilhas produzidas a partir das misturas usadas para fabrico dos ICC's.

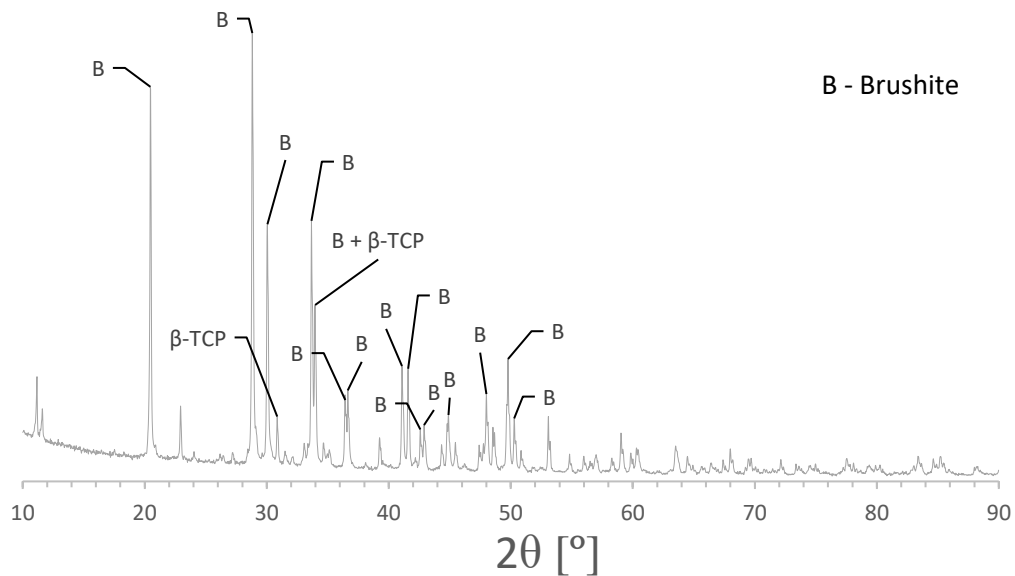


Figura 3.11 - Difratograma de DRX da amostra de brushite após maturação completa do cimento.

Predominantemente, verifica-se a presença dos picos da fase cristalina da brushite (JCPDS #09-0077). Porém o pico mais intenso de  $\beta$ -TCP, a  $\approx 31^\circ$ , pode ser identificado (JCPDS #09-0169). Além deste, outro presumível pico de  $\beta$ -TCP pode ser encontrado, a  $\approx 34^\circ$ , porém este é sobreposto por um pico de brushite. Todavia a presença de  $\beta$ -TCP, não reagido é espectável, embora que em pequenas quantidades, o que é o caso dos cimentos aqui produzidos: embora não se tenha feito uma quantificação das fases presentes o difratograma revela a presença maioritária de picos referentes à brushite. A presença de  $\beta$ -TCP ocorre por consequência da preparação do cimento, que intencionalmente não possui uma razão equimolar entre o  $\beta$ -TCP e o MCPM, necessária para a reação completa destes em brushite, sendo assim o MCPM o reagente limitante. A presença de  $\beta$ -TCP não reagido em cimentos de brushite, é descrito na literatura [9], como um reforço que incrementa as propriedades mecânicas do mesmo.

### 3.2.2 Ensaio de compressão dos ICC's

Os ensaios de compressão foram aplicados a 10 ICC's de brushite, produzidos com a mistura L/S considerada ideal (L/S de 0.35 com glicerol a 7.5%). As curvas de compressão obtidas apresentam o andamento observado na figura 3.12.

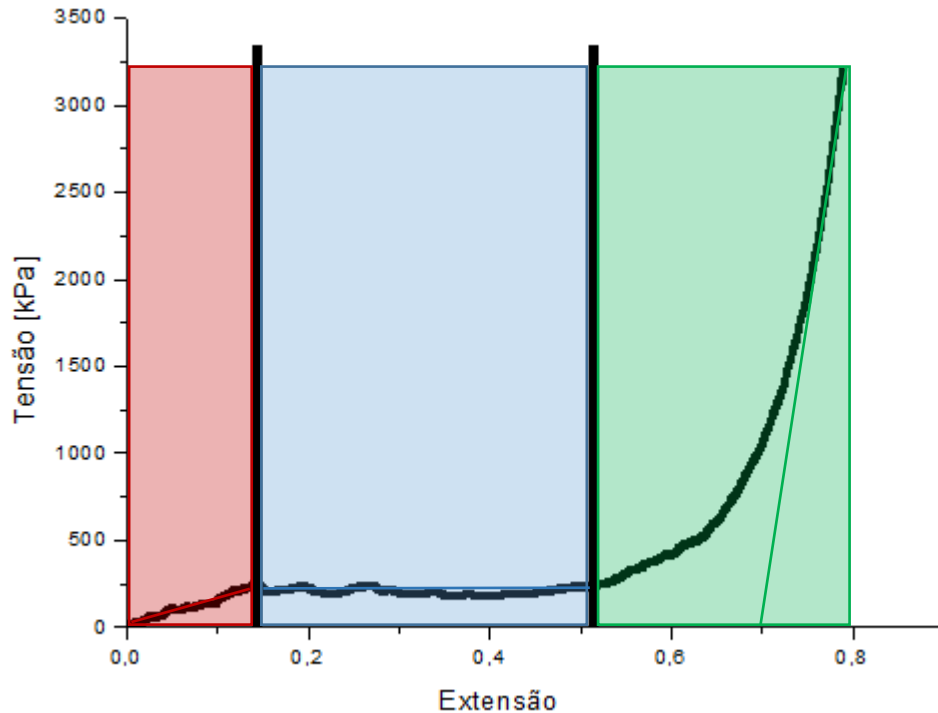


Figura 3.12 - Curva representativa de tensão vs. extensão para os ICC's de brushite.

Como se pode observar pela fig. 3.12, as curvas de compressão apresentam três regiões distintas. Primeiro, uma região aproximadamente linear, cujo declive representa o módulo de Young,  $E_y$  da espuma. A esta segue-se um patamar de colapso. Desta secção é possível retirar a tensão de colapso,  $\sigma^*$ , pela intersecção das tangentes a esta região e à anterior. Finalmente, a última região corresponde à densificação da espuma, onde se dá um aumento brusco da tensão. O valor inicial da extensão desta região corresponde à extensão inicial de densificação,  $\epsilon_{di}$ . Nesta região a curva apresenta um comportamento exponencial, ocorrendo uma subida rápida da tensão. Por fim, através da intersecção da reta tangente à porção final do gráfico e eixo das abcissas é possível obter a extensão final de densificação,  $\epsilon_{df}$  [21].

|               | $E_y$ [kPa] | $\sigma^*$ [kPa] | $\epsilon_{di}$ | $\epsilon_{df}$ |
|---------------|-------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Média         | 2010        | 215              | 0.51            | 0.67            |
| Desvio Padrão | 249         | 42               | 0.03            | 0.03            |

Tabela 3.3 – Valores característicos dos parâmetros mecânicos dos ICC's de brushite, produzidos à base de misturas de brushite com L/S de 0.35 e glicerol a 7.5%.

A tabela 3.3 compila os valores característicos descritos, obtidos das dez amostras. O valor do módulo de Young pode ser confrontado com o modelo matemático de Gibson-Ashby, para espumas de células abertas, através da seguinte equação [21]:

$$\frac{E}{E_s} = C \left( \frac{\rho}{\rho_s} \right)^2 \quad (5)$$

$$C \sim 1 \quad (6)$$

Sendo  $E_s$  o módulo de Young da Brushite nas paredes do ICC, e  $\rho_s$  a sua densidade. Por outro lado, para as razões entre as densidades do ICC e das suas paredes, podemos ainda deduzir que:

$$\frac{\rho}{\rho_s} = 1 - P \quad (7)$$

Onde P representa a porosidade do ICC. Temos também que, para uma estrutura hexagonal compacta, como é o caso do ICC, apresenta uma porosidade mínima de 0.76 (correspondente ao fator de empacotamento da estrutura do CC que lhe deu origem). Temos então que:

$$\frac{\rho}{\rho_s} \leq 0.24 \quad (8)$$

|                       | Média | Desvio Padrão |
|-----------------------|-------|---------------|
| Módulo de Young [MPa] | 199   | 28            |

Tabela 3.4 Valor do módulo de Young, de provetes de brushite compacta, produzidos a partir de misturas de brushite com L/S de 0.35 e glicerol a 7.5%.

Para obter uma aproximação dos valores de  $E_s$ , foram retirados os módulos de Young de 10 provetes de brushite compacta, tendo sido obtidos os valores presentes na tabela 3.4. Porém, assumindo que a densidade da brushite das paredes dos ICC's possa ser inferior à densidade dos provetes de brushite compacta, é necessário denotar que:

$$\frac{E}{E_0} \leq \frac{E}{E_s} \quad (9)$$

Sendo  $E_0$  o valor do módulo de Young dos provetes de brushite produzidos. Temos por fim que:

$$E \leq E_0 \times 0.24^2 \quad (10)$$

O valor do módulo de Young previsto para os ICC's pelo modelo de Gibson-Ashby deverá ser  $E \approx 11.5$  MPa. O valor do módulo de Young obtido para os ICC's de brushite foi de aproximadamente 2 MPa, e que respeita a relação anterior. Verifica-se que o valor máximo para o módulo de Young, previsto pelo modelo de Gibson-Ashby é uma ordem de grandeza superior ao obtido experimentalmente. Contudo, deve-se ter em conta que a porosidade real dos ICC deverá ser superior a 76%, tendo em conta as observações feitas em SEM. Tendo em conta as equações (5) e (7), facilmente se verifica que um módulo de Young de 2 MPa é obtido para uma porosidade da ordem de 90%. Este elevado valor de porosidade parecer ser compatível com as observações feitas em SEM, pelo que o modelo de Gibson-Ashby parece ser adequado para prever o comportamento mecânico destes ICC. Contudo, este fato só poderia ser absolutamente confirmado por medidas da porosidade dos ICC (ex.: método de Arquimedes).

### 3.3 Ensaios in-vitro

#### 3.3.1 Citotoxicidade dos ICC's

A análise à citotoxicidade dos ICC's produzidos tem como objetivo a avaliação da viabilidade celular das sementeiras quando expostas ao extrato dos ICC's, de forma a determinar os efeitos da colocação dos próprios em contacto com o organismo. O ensaio comporta a exposição de sementeiras de células SAOS-2 a extratos de diferentes concentrações, sendo a concentração inicial de 53 mg/ml, designada por  $C_0$ , e as seguintes concentrações subseqüentes diluições. O ensaio permite a obtenção de valores correlacionados com a população celular das sementeiras após terminado o tempo de exposição ao extrato. Esses valores encontram-se compilados na tabela 3.5, assim como os valores correspondentes ao controlo negativo (C-) e o controlo positivo (C+).

|          | Média | Desvio Padrão |
|----------|-------|---------------|
| $C_0$    | 0.026 | 0.003         |
| $C_0/2$  | 0.466 | 0.01          |
| $C_0/4$  | 0.466 | 0.02          |
| $C_0/8$  | 0.478 | 0.02          |
| $C_0/16$ | 0.497 | 0.01          |
| C-       | 0.559 | 0.01          |
| C+       | 0.021 | 0.02          |

Tabela 3.5 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade aos ICC's de brushite.

Através dos dados da tabela 3.5 é possível obter os valores da viabilidade celular para os extratos de diferentes concentrações, presentes na tabela 3.6.

| %        | Média | Desvio Padrão |
|----------|-------|---------------|
| $C_0$    | 4     | 1             |
| $C_0/2$  | 83    | 3             |
| $C_0/4$  | 83    | 4             |
| $C_0/8$  | 85    | 4             |
| $C_0/16$ | 89    | 3             |

Tabela 3.6 - Viabilidade celular das sementeiras expostas a extratos de diferentes concentrações, de ICC's de brushite.

Pode-se concluir que os ICC's não apresentam comportamento citotóxico para a primeira diluição do extrato, correspondendo a uma concentração de 27 mg/ml. Estes valores carecem de um estudo que confronte se estes são representativos de valores obtidos para aplicações *in vivo* dos ICC's.

### 3.3.2 Adesão e proliferação celular nos ICC's

Para complementar a avaliação da citotoxicidade dos ICC's, foi realizado um ensaio de adesão celular que, determina da taxa de células aderidas aos mesmos, assim como um ensaio de proliferação celular, que permite a avaliação da evolução da população ao longo do tempo. Na tabela 3.7, é apresentado o valor da taxa de adesão celular aos ICC's.

|                    | Média | Desvio Padrão |
|--------------------|-------|---------------|
| Adesão Celular [%] | 50    | 1             |

Tabela 3.7 – Valor médio da taxa de adesão celular nos ICC's.

Verifica-se uma taxa de adesão celular de 50% aos ICC's, representando este um valor aceitável.

Os ensaios de proliferação decorreram durante um período de 13 dias, sendo o primeiro dia referente aos valores do ensaio da adesão celular. Os resultados da proliferação celular são confrontados com um controlo, que representa neste ensaio sementinhas produzidas no fundo de poços vazios. A compilação dos valores das taxas de proliferação está presente na figura 3.13.

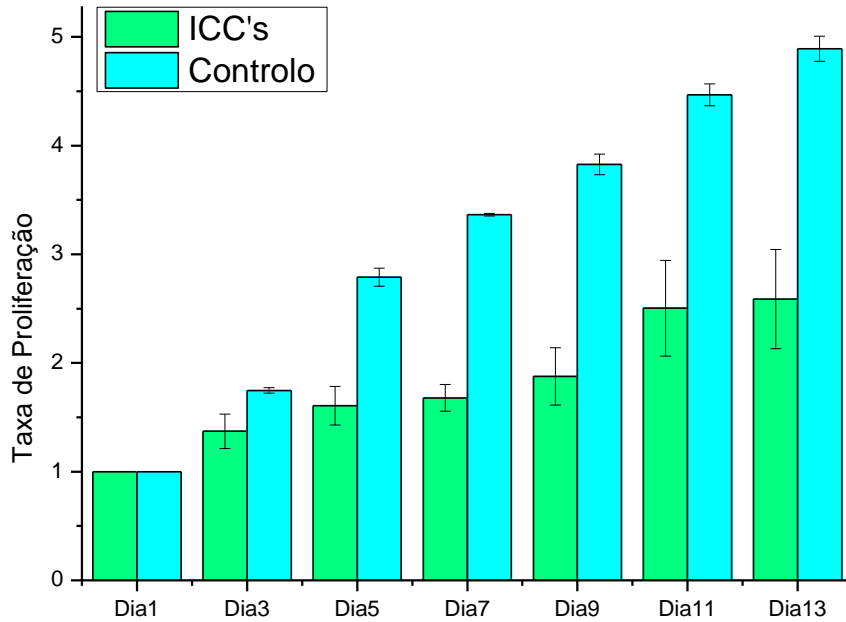


Figura 3.13 - Taxa de proliferação celular dos ICC's de brushite, em comparação com o controlo, durante um período de 13 dias.

Pode se observar que as taxas de proliferação celular nos ICC's embora apresente valores inferiores ao do controlo, acompanha o ritmo de crescimento deste. Ao fim do período de 13 dias a proliferação celular nos ICC's foi de  $259 \pm 46\%$ , enquanto que a taxa de proliferação celular no controlo foi, para o mesmo período de  $489 \pm 12\%$ .

## 4 Conclusões e Perspetivas Futuras

A presente dissertação teve como objetivo a produção de ICC's à base de cimentos de brushite para a regeneração óssea. O desenvolvimento desta foi realizado em duas etapas. Inicialmente, fez-se uma otimização dos parâmetros de produção das réplicas invertidas de brushite. Seguidamente, fez-se a análise das características físico-químicas, estruturais e mecânicas das amostras produzidas pelo processo otimizado, e a avaliação da compatibilidade destas, no cenário de aplicação como substituinte ósseo.

A otimização dos parâmetros de produção dos ICC's de brushite, passou pela formulação de um cimento cujas características de endurecimento se coadunassem com as exigências dos processos de impregnação dos cristais coloidais. Os parâmetros analisados, foram a percentagem de glicerol e a razão L/S nos cimentos de brushite. Foi observável nos ensaios de tempo de presa e reológicos que o aumento da percentagem de glicerol na composição do cimento, influencia fortemente no aumento da janela de oportunidade durante a qual, é possível a impregnação dos CC's. Porém, para as amostras de 10% de glicerol, verificou-se uma menor densificação das paredes dos ICC's produzidos. Por outro lado, concentrações de glicerol inferiores ou iguais a 5%, provaram não oferecer as condições necessárias para uma correta impregnação das estruturas dos cristais coloidais, como pode ser observado pela análise realizada por SEM. Também a razão L/S provou ser um fator de suma importância. A viscosidade das amostras produzidas a partir de misturas com L/S de 0.35, mantém-se próxima da viscosidade inicial, até o cimento entrar dentro do domínio de presa. Por outro lado, amostras produzidas a partir de misturas com L/S de 0.25, apresentam uma viscosidade com um crescimento gradual desde da preparação do cimento. Verificou-se que a mistura ótima para impregnação possui uma razão L/S de 0.35 e percentagem de glicerol de 7.5%. Estes parâmetros permitem a obtenção de ICC's estruturalmente íntegros e com paredes de densidade apreciável.

Na base da receita da produção do cimento de brushite foram usados MCPM e  $\beta$ -TCP num rácio de 45/55 % p/p respetivamente. Tal formulação levaria a presença de  $\beta$ -TCP não reagido no cimento, que funcionaria como reforço da brushite. O  $\beta$ -TCP não reagido foi detetado nas análises de DRX.

Os ICC's produzidos apresentaram um comportamento correspondente a uma espuma com comportamento frágil, típico de materiais cerâmicos. Os valores médios do

módulo de Young e da tensão de colapso obtidos foram de 2 MPa e de 215 kPa respectivamente. Estes valores encontram-se muito afastados dos correspondentes a osso trabecular, pelo que a produção destas estruturas carece de otimização futura. O valor do módulo de Young dos ICC's também foi confrontado com o valor previsto pelo modelo de Gibson-Ashby, de 11.5 MPa. A diferença entre o valor do módulo de Young medido e o valor previsto pelo modelo, pode estar associado a uma densificação deficiente da brushite nas paredes do ICC. É necessária uma otimização na abordagem ao método de impregnação dos ICC's, a fim de melhorar os resultados obtidos para a densidade das suas paredes.

Os ensaios de citotoxicidade aos ICC's demonstraram a inexistência de comportamento citotóxico para concentrações de extrato de 27 mg/ml. Estudos futuros são necessários para identificar se estes valores de concentrações são representativos de condições de aplicação dos ICC's *in vivo*. Para os ensaios de adesão celular obteve-se uma taxa de adesão de  $50\pm 1\%$ , um valor aceitável. A proliferação celular, avaliada ao longo de um período de 13 dias, foi nos ICC's de  $259\pm 46\%$ . Inferior quando comparada ao controlo, que obteve no mesmo período de tempo uma proliferação celular de  $489\pm 12\%$ . Contudo observou-se que o crescimento da população celular nos ICC's acompanhou a do controlo.

Tendo em conta os resultados, é possível concluir que o método proposto para a obtenção de ICC's de brushite, necessita de ser otimizado. A fim de se obter um incremento das propriedades mecânicas dos ICC's, a utilização de um polímero como matriz da brushite, é uma solução que tem o potencial de não só aproximar os ICC's das características do osso nativo, como criar novas possibilidades para a obtenção de ICC's com propriedades mecânicas mais próximas a este.

## Referências

- [1] Yunus Basha, R., Sampath, S. K., & Doble, M. (2015). Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *57*, 452–463. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.016>
- [2] Cabrejos-Azama, J., Alkhraisat, M. H., Rueda, C., Torres, J., Blanco, L., & López-Cabarcos, E. (2014). Magnesium substitution in brushite cements for enhanced bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *43*, 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.036>
- [3] García-Gareta, E., Coathup, M. J., & Blunn, G. W. (2015). Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*, *81*, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.007>
- [4] Cama, G., Barberis, F., Capurro, M., Di Silvio, L., & Deb, S. (2011). Tailoring brushite for in situ setting bone cements. *Materials Chemistry and Physics*, *130*(3), 1139–1145. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.08.047>
- [5] Cama, G., Barberis, F., Botter, R., Cirillo, P., Capurro, M., Quarto, R., Valbusa, U. (2009). Preparation and properties of macroporous brushite bone cements. *Acta Biomaterialia*, *5*(6), 2161–2168. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.02.012>
- [6] Geffers, M., Barralet, J. E., Grolla, J., & Gbureck, U. (2015). Dual-setting brushite-silica gel cements. *Acta Biomaterialia*, *11*(1), 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.036>
- [7] Tamimi, F., Sheikh, Z., & Barralet, J. (2012). Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite. *Acta Biomaterialia*, *8*(2), 474–487. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.08.005>
- [8] Zhang, J. T., Tancret, F., & Bouler, J. M. (2011). Fabrication and mechanical properties of calcium phosphate cements (CPC) for bone substitution. *Materials Science and Engineering C*, *31*(4), 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.10.014>
- [9] Engstrand, J., Persson, C., & Engqvist, H. (2014). The effect of composition on mechanical properties of brushite cements. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *29*, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.08.024>
- [10] Mansos, P. (2008). Produção de cimentos ósseos à base de Fosfato de Cálcio. <http://hdl.handle.net/10362/13527>

- [11] João, C. F. C., Vasconcelos, J. M., Silva, J. C., & Borges, J. P. (2014). An Overview of Inverted Colloidal Crystal Systems for Tissue Engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 20(5), 437–454. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2013.0402>
- [12] Shanbhag, S., Woo Lee, J., & Kotov, N. (2005). Diffusion in three-dimensionally ordered scaffolds with inverted colloidal crystal geometry. *Biomaterials*, 26(27), 5581–5585. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.059>
- [13] Lee, J., Cuddihy, M. J., Cater, G. M., & Kotov, N. A. (2009). Engineering liver tissue spheroids with inverted colloidal crystal scaffolds. *Biomaterials*, 30(27), 4687–4694. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.024>
- [14] Shanbhag, S., Wang, S., & Kotov, N. A. (2005). Cell distribution profiles in three-dimensional scaffolds with inverted-colloidal-crystal geometry: Modeling and experimental investigations. *Small*, 1(12), 1208–1214. <https://doi.org/10.1002/sml.200500191>
- [15] Zhang, Y., Wang, S., Eghtedari, M., Motamedi, M., & Kotov, N. A. (2005). Inverted-colloidal-crystal hydrogel matrices as three-dimensional cell scaffolds. *Advanced Functional Materials*, 15(5), 725–731. <https://doi.org/10.1002/adfm.200400325>
- [16] Nichols, J. E., Cortiella, J., Lee, J., Niles, J. A., Cuddihy, M., Wang, S., Kotov, N. A. (2009). In vitro analog of human bone marrow from 3D scaffolds with biomimetic inverted colloidal crystal geometry. *Biomaterials*, 30(6), 1071–1079. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.041>
- [17] Kotov, N. A., Liu, Y., Wang, S., Cumming, C., Eghtedari, M., Vargas, G., Cortiella, J. (2004). Scaffolds, 20(19). <https://doi.org/10.1021/la049958o>
- [18] João, C. F. C. (2016). Inverted Colloidal Crystal Scaffolds: New Substitutes for Bone Tissue Engineering. Tese de Doutorado. FCT/UNL (<http://hdl.handle.net/10362/19891>)
- [19] Leroux, L., Hatim, Z., Frèche, M., & Lacout, J. L. (1999). Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone*, 25(SUPPL. 1), 31–34. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00130-1](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00130-1)
- [20] Bohner\_et\_al-1996-Journal\_of\_the\_American\_Ceramic\_Society.pdf. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1996.tb08746.x>
- [21] Gibson, L. J., & Ashby, M. F. (1982). The Mechanics of Three-Dimensional Cellular Materials. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 382(1782), 43–59. <https://doi.org/10.1098/rspa.1982.0088>

# Anexos

## Anexo I - Processos de produção dos ICC's

### *Produção das Esferas*

Para a obtenção de microesferas monodispersas, recorreu-se à montagem de um sistema de microfluídica baseado no reportado por João et. al [18]. Visa-se a sua utilização para a produção das esferas na construção do cristal coloidal. Neste sistema usou-se uma solução de PVA a 5% v/w, como fase contínua e PS a 5% v/w como fase descontínua, com fluxos de 10 ml/h e 3 ml/h respetivamente. As esferas são produzidas quando as duas fases se encontram no canal de microfluídica (com 0.8mm) e são recolhidas num banho de PVA de concentração igual à da fase contínua. O banho encontra-se sob agitação, promovida pelo agitador orbital (VWR® Standart Analog Shaker, modelo 1000) a 100 rpm entre 24-48h. Após este tempo as esferas encontram-se secas, e são recolhidas e armazenadas em recipientes adequados para uso posterior.

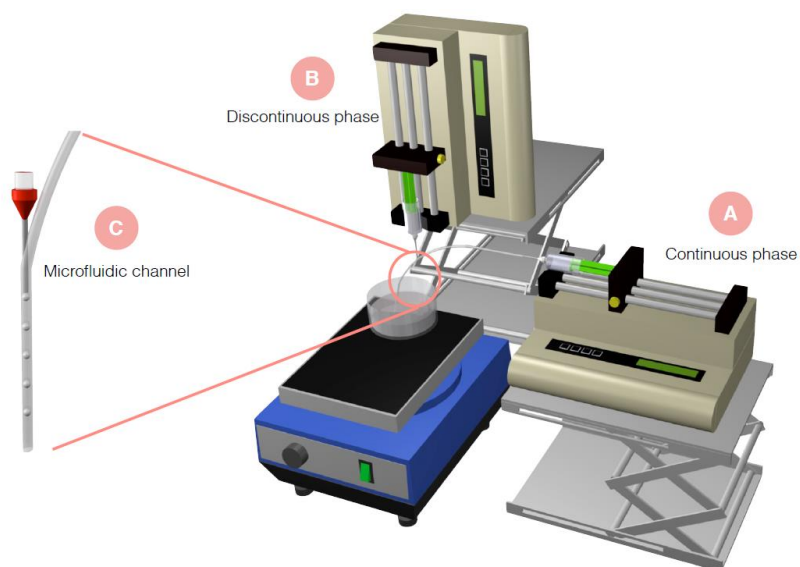


Figura 4.1 - Esquema do sistema de microfluídica usado na produção de microesferas, adaptado de João et. al [18].

### *Enformação dos Cristais Coloidais*

As esferas de PS previamente obtidas são agora usadas na produção dos cristais coloidais. Recorreu-se a um molde para promover a enformação dos CC's.

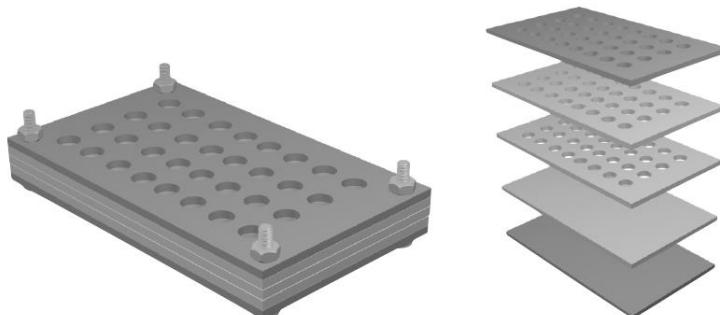


Figura 4.2 - Esquema do molde de enformação dos cristais coloidais, constituído por duas camadas de alumínio (superior e inferior) e três camadas de teflon [18].

Para a produção de cada CC são pesados 40 mg de esferas de PS e colocadas no respetivo poço. Então são pipetados 150  $\mu$ l de isopropanol em cada poço com as esferas. O molde é então colocado num banho de ultrassons (Bandelin Sonorex Super RK 510H) por 15 minutos, e de seguida em agitação no agitador orbital (VWR® Standart Analog Shaker, modelo 1000) a 100 rpm durante 1 hora. Após isso o molde é colocado no forno (Memmert) a 130°C durante 4 horas. No final o molde é removido do forno, deixado a arrefecer à temperatura ambiente, e após o arrefecimento os CC's são removidos e armazenados em recipientes adequados para uso posterior [18].

### *Impregnação dos Cristais Coloidais por Brushite*

O primeiro passo na produção dos ICC's é a preparação do cimento de brushite. Foram preparadas misturas com diferentes concentrações de glicerol, nomeadamente 5%, 7.5% e 10% p/p. O método usado requer preparação de uma fase sólida constituída por 1% p/p de pirofosfato de sódio, glicerol nas suas respetivas percentagens, e uma mistura de MCPM e  $\beta$ -TCP numa razão de 45/55 respetivamente. Assim como uma fase líquida de ácido cítrico a 0.5M e ácido sulfúrico a 0.1M. Finalizada a preparação, as duas fases foram misturadas num rácio líquido-sólido de 0.25 ou 0.35 ml/ g. Esta preparação foi desenvolvida, baseada nas soluções reportadas na literatura [9], [19], [20]. Após homogeneizada a mistura, são adicionados os CC's previamente produzidos e são envolvidos no cimento. Para a indução da impregnação dos interstícios dos CC's pelo cimento, estes são sujeitos a ciclos de vácuo, promovido pela bomba de vácuo (Edwards, XDS 5), e admissão de ar. Após a impregnação os CC's são retirados do cimento, é removido

excesso de material superficial e então armazenados à temperatura ambiente durante 24h finalizando a maturação do cimento. Terminado este período são colocados num banho de diclorometano e em agitação no agitador orbital (VWR® Standart Analog Shaker, modelo 1000), para remoção das esferas de PS. São deixadas durante 24 horas e passado esse período são removidos do banho, deixadas a secar e armazenadas. No final deste processo são obtidos os ICC's de brushite.



## Anexo II - Metodologias para a seleção de parâmetros

### *Microscopia ótica*

As observações por microscopia ótica, realizadas as microesferas e aos CC's, foram realizados no Departamento de Ciência dos Materiais (DCM, FCT/UNL).

As observações foram realizadas no microscópio (Olympus, BX51), as imagens recolhidas pela câmara (Olympus, DP73) e processadas no *software* Olympus *Stream Basic*. Foram recolhidas imagens das microesferas, de forma a avaliar a sua dimensão e morfologia. Foram analisadas 20 imagens para obtenção dos diâmetros médios das esferas. O desvio padrão foi obtido com um grau de confiança de 5% para a média.

### *Tempo de Presa*

A formulação do ensaio comporta a produção de cimentos de brushite a partir de misturas com diferentes rácios líquido-sólido e percentagem em massa de glicerol, resultando no total de 8 amostras. Para cada amostra foram produzidas 10 réplicas. A determinação do tempo final de presa foi realizada com recurso a um sistema de Agulha de Vicat. Considera-se que o tempo final de presa foi atingido quando o componente anelar da agulha de Vicat não produz uma indentação no cimento no ponto de contacto entre estes. A avaliação dos tempos de presa foi realizada em análises periódicas de 30 minutos.

### *Ensaio reológicos*

Os ensaios reológicos foram elaborados nas instalações do CENIMAT recorrendo ao reómetro (MALVERN, Bohlin Gemini HR Nano Rheometer), sob a orientação do Professor doutor João Paulo Borges.

O ensaio consiste na análise reológica dos cimentos de brushite, cujos parâmetros de produção foram variados, especificamente, o rácio líquido-sólido e a percentagem em massa de glicerol. Medições foram realizadas para vários tempos do endurecimento do cimento, sendo considerado o zero o momento da preparação.

Para as medições recorreu-se à geometria de pratos planos. Foi aplicada às amostras, uma deformação inicial de  $10 \text{ s}^{-1}$  durante 4 minutos, para garantir um estado estacionário. A variação da viscosidade ao longo do tempo foi analisada a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , para uma taxa constante de  $10 \text{ s}^{-1}$ .

### *Microscopia por varrimento de Eletrões*

As análises de SEM aos ICC's, foram realizadas nas instalações do CEMOP recorrendo ao Microscópio Eletrónico de Varrimento (Hitachi, TM4000Plus).

O sistema de SEM permitiu a observação da morfologia dos ICC's. Antes da observação em SEM as amostras foram sujeitas a *sputtering*, produzindo um revestimento condutivo de ouro. As imagens de SEM foram obtidas para um feixe de eletrões a 5 kV.

## Anexo III - Metodologias para a caracterização estrutural e mecânica

### *Difração de Raio-X*

Os ensaios de DRX foram elaborados nas instalações do CENIMAT recorrendo ao Difrátometro de Raio-X (Phylips X'Pert PRO).

Para este foram preparadas pastilhas de brushite segundo o mesmo procedimento realizado para a preparação das pastilhas para a determinação do tempo de presa. Para a obtenção dos difratogramas foi usada radiação monocromática de cobre ( $\text{Cu}_{K\alpha}$ ) com um comprimento de onda  $\lambda = 0.154060$  nm. As análises foram registadas em intervalos de  $0.033^\circ$  para um intervalo de  $2\theta$  compreendido entre os  $10^\circ$  e os  $90^\circ$ .

### *Ensaio de compressão*

Os ensaios de compressão dos ICC's foram executados com recurso a uma máquina de tração, marca Honeywell, modelo 31E200N0, equipada com uma célula de carga de 100N. Para a recolha de curvas características de compressão, 10 ICC's de brushite foram sujeitos ao ensaio. Os ensaios foram realizados a uma velocidade de 0,7 mm/min. De forma a evitar danos da célula de carga, os ensaios foram interrompidos quando a força nominal atingia o valor máximo de 90 N.



## Anexo IV – Metodologias dos ensaios in-vitro

### *Ensaio de citotoxicidade*

Os ensaios de citotoxicidade foram executados no Departamento de Física (DF, FCT/UNL), sob a orientação do professor doutor Jorge Carvalho Silva.

Os ICC's e as pastilhas de brushite foram esterilizadas em etanol a 70% e colocados numa estufa (P-Selecta®) a 80 °C durante 3h. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com a exposição das células SAOS-2 ao extrato obtido do contacto do meio de cultura com as respetivas amostras. Uma amostra de ICC's com 74mg e uma de cimento compacto com 269 mg foram expostos a 2 ml de meio de cultura e colocados na estufa (SANYO, MCO – 19AIC) durante 48 horas a 37°C. Para a preparação da sementeira, foram colocados nos poços de uma placa de 96 poços 100 µl de meio com células, numa concentração de 20 mil células/cm<sup>2</sup> e a placa colocada na estufa durante 24 horas a 37°C

A estrutura do ensaio consiste em 5 réplicas para cada amostra, na qual cada poço da primeira linha da placa é exposto ao extrato na sua concentração inicial (C<sub>0</sub>) e cada poço subsequente é exposto a uma diluição de fator 2 do prévio, resultando em diluições máximas de C<sub>0/32</sub> para os ICC's e de C<sub>0/64</sub> para o cimento compacto. O controlo positivo (C+) foi exposto a 10 µl de DMSO, enquanto que o controlo negativo (C-) permaneceu em meio de cultura. Após a adição dos extratos, a placa é colocada de novo na estufa durante 48 horas a 37°C. Para o teste de citotoxicidade recorreu-se à avaliação da viabilidade celular com resazurina e foram avaliadas as absorvâncias, a 570nm e a 600nm, de cada meio. Esta leitura foi realizada pelo sistema BioTek® ELx800.

### *Adesão e Proliferação Celular*

Os ensaios de adesão e proliferação celular foram executados no Departamento de Física (DF, FCT/UNL) sob a orientação do professor doutor Jorge Carvalho Silva.

Os ICC's e pastilhas de brushite compacta foram esterilizadas da mesma forma que para o ensaio de citotoxicidade. Os ensaios foram realizados com recurso a sementeiras de células SAOS-2. A estrutura do ensaio consiste em 3 réplicas, nas quais foram usadas quatro amostras por poço de uma placa de 24 poços, assim como um controlo de células semeadas diretamente na placa. A sementeira foi realizada colocando 1 ml de meio de cultura, em cada réplica e uma densidade de 20 mil células/cm<sup>2</sup>. Finalizada a sementeira as amostras foram colocadas na estufa (SANYO, MCO – 19AIC) a 37°C durante 24 horas. Para o teste de adesão, recorreu-se à avaliação da viabilidade celular

com ressazurina tal como no ensaio de citotoxicidade. O teste de proliferação celular é realizado 48h após o teste de adesão, segundo o mesmo protocolo, e de 48h em 48h durante 10 dias, de forma a avaliar a evolução da população celular.