



**Ana Catarina Ventura Pepe**

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

## **Membranas Compósitas para Aplicação em Regeneração Óssea Guiada**

Dissertação para obtenção do Grau de  
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadora: Célia Reis Henriques, Professora Auxiliar,  
FCT-UNL

Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar,  
FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof.<sup>a</sup> Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof.<sup>a</sup> Regina da Conceição Corredeira Monteiro

Vogal: Prof.<sup>a</sup> Célia Reis Henriques



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro, 2016**



## **Membranas Compósitas para Aplicação em Regeneração Óssea Guiada**

Copyright © Ana Catarina Ventura Pepe, 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 objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*Às minhas avós*



## AGRADECIMENTOS

A vida é uma jornada repleta de desafios. Tenho a sorte de ter sempre ao meu lado pessoas muito especiais que me ajudam diariamente a crescer e a enfrentar os desafios impostos pela vida. Ao longo deste trabalho, contei com a presença de pessoas espetaculares que me apoiaram de forma exemplar.

Em primeiro lugar, quero expressar um especial agradecimento à minha orientadora, Professora Célia Henriques, por me ter acompanhado e me ter transmitido diversos conhecimentos sem os quais não seria possível a realização deste projeto. Por ter acreditado no meu trabalho e me ter aceite como sua orientanda.

Quero, de igual forma, agradecer ao meu co-orientador Professor Jorge Silva por toda a sua disponibilidade e pelo seu apoio desde o primeiro dia. Agradeço também pelo incentivo para ultrapassar os obstáculos que surgiram ao longo desta caminhada. Ao Professor João Paulo Borges pela partilha de conhecimentos e apoio prestado.

Agradeço à Professora Paulina Faria e ao Engenheiro Vítor Silva pela disponibilidade e por cederem o aparelho de Vicat durante o tempo necessário. Agradeço ao CENIMAT/I3N pelos serviços externos prestados. Aos responsáveis do Laboratório de Polímeros, do DCM-FCT por permitirem a utilização constante da máquina de tração.

Às minhas companheiras do Laboratório, Ana Nogueira, Carolina, Fradinho, Susana e Tânia, por tornaram os meus dias mais felizes ao longo dos oito maravilhosos meses e por todo o espírito de entre-ajuda. Sem vocês esta jornada não teria tido o mesmo significado.

Aos meus amigos de infância e de longa data por estarem sempre ao meu lado e me acompanharem ao longo da minha vida.

A todos os meus amigos da faculdade por todos os bons momentos vivenciados. Um especial obrigado ao Herberto, MV, Eliseu, Maria Pia, Mariana, Miguel e Susana por todo o apoio e amizade verdadeira ao longo destes 5 anos, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu amor, Guilherme Machado, por ser o meu melhor amigo e um suporte fundamental na minha vida. Por todo o amor, incentivo e paciência demonstrado e por estar sempre presente nas melhores e piores alturas.

Para finalizar, um enorme agradecimento a toda a minha família, pelo apoio incondicional que têm demonstrado em todas as etapas da minha vida. Em especial, à minha irmã Inês pela amizade e dedicação ao longo destes anos e aos meus pais pela educação e valores que me incutiram. Obrigado por me mostrarem que nem sempre o melhor caminho é o mais fácil e por nunca me deixarem desistir.



## RESUMO

---

Na área da estomatologia, a perda de tecido ósseo apresenta sérios problemas, nomeadamente na colocação de implantes dentários. As membranas oclusivas são usadas em regeneração óssea guiada para impedir a invaginação do tecido mole na cavidade óssea.

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma membrana oclusiva que se adapte facilmente ao contorno anatómico e que se possa estabilizar. Para tal, conjugou-se a uma membrana oclusiva de policaprolactona (PCL), produzida por eletrofiação, com um cimento de fosfato de cálcio (brushite) capaz de a fixar.

Procedeu-se à caracterização das propriedades relevantes para a membrana polimérica (morfologia, porosidade, propriedades mecânicas, degradação enzimática e por espécies reativas de oxigénio) e para a brushite (tempo de presa, teste de coesão, Difração de Raios-X e citotoxicidade). As membranas apresentam uma morfologia e taxa de degradação adequadas e a brushite cumpre os requisitos de tempo de presa e coesão essenciais para a sua aplicação. Embora extratos deste material apresentem citotoxicidade após as primeiras 24 h de lixiviação, esta desaparece para intervalos de tempo subsequentes, de acordo com testes realizados *in vitro*. Através do DRX, verificou-se a conversão de brushite em monetite após os cimentos terem sido imersos em PBS durante 32 dias.

Verificou-se que é possível integrar o material de estabilização na membrana sem comprometer a flexibilidade da mesma e conferindo a rigidez adicional pretendida, necessária aos procedimentos para a sua colocação.

**Palavras-chave:** Eletrofiação; Policaprolactona; Brushite; Cimentos de fosfato de cálcio; Regeneração Óssea Guiada; Membrana oclusiva

---



## ABSTRACT

---

In dental practice, the loss of bone tissue exhibits serious problems particularly for the placement of dental implants. As a solution to this problematic, occlusive membranes are used for guided bone regeneration, in order to prevent soft tissue ingrowth into the bone cavity.

The aim of this study was to develop a biodegradable occlusive membrane that easily adapts to the anatomical contour of the defect, by electrospinning solutions of polycaprolactone conjugated with a calcium phosphate cement (brushite) able to fix the membrane.

An evaluation of specific properties for both the polymeric membrane (morphology, porosity, mechanical properties, enzymatic and reactive oxygen species degradation) and for the brushite (setting time, particle release, X-Ray Diffraction and *in vitro* tests) was performed, as to reach the previously mentioned goal. The membranes have an adequate degradation rate and morphology. As for the brushite, it fulfils the necessary requirements for its application in terms of setting time and particle release from cement surface. Although extracts of this material exhibit cytotoxicity after the first 24h of leaching, such effects disappear with time, according to *in vitro* tests. XRD showed that brushite converts to monetite after being immersed in PBS for 32 days.

The results showed the possibility to integrate the produced stabilizing material in the membrane without compromising its flexibility, which is required for its placement in the defect.

**Keywords:** Electrospinning; Polycaprolactone; Brushite; Calcium Phosphate Cement; Guided Bone Regeneration; Occlusive membrane

---



# CONTEÚDO

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xix</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento . . . . .	1
1.2 Tecido ósseo . . . . .	4
1.3 Regeneração óssea guiada . . . . .	5
1.3.1 Membranas oclusivas . . . . .	5
1.4 Cimentos de Fosfato de cálcio . . . . .	8
1.4.1 Brushite . . . . .	10
<b>2 Métodos de produção e caracterização da membrana</b>	<b>15</b>
2.1 Materiais . . . . .	15
2.2 Electrofiação . . . . .	16
2.2.1 Preparação das soluções . . . . .	17
2.2.2 Montagem experimental . . . . .	19
2.2.3 Procedimento experimental . . . . .	20
2.3 Métodos experimentais . . . . .	20
2.3.1 Caracterização morfológica . . . . .	20
2.3.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento . . . . .	21
2.3.3 Ensaio de tração . . . . .	22
2.3.4 Testes de degradação . . . . .	23
<b>3 Métodos de produção e caracterização da brushite</b>	<b>27</b>
3.1 Materiais . . . . .	27
3.2 Produção da brushite . . . . .	28
3.2.1 Fase sólida . . . . .	28
3.2.2 Fase líquida . . . . .	28
3.2.3 Mistura das fases sólida e líquida . . . . .	29
3.3 Tempo de presa . . . . .	29
3.4 Teste de coesão . . . . .	31
3.5 Difração de Raios-X . . . . .	31

3.6	Teste de citotoxicidade . . . . .	32
<b>4</b>	<b>Estudo da incorporação da brushite na membrana</b>	<b>33</b>
4.1	Estudo da incorporação . . . . .	33
4.2	Tratamento com NaOH . . . . .	34
4.3	Distribuição granumétrica e moagem dos pós . . . . .	34
4.4	SEM . . . . .	34
<b>5</b>	<b>Apresentação e discussão dos resultados</b>	<b>35</b>
5.1	Variação dos parâmetros de produção das membranas . . . . .	35
5.2	Caraterização das membranas . . . . .	41
5.2.1	Morfologia das membranas . . . . .	41
5.2.2	Porosidade . . . . .	43
5.2.3	Calorimetria Diferencial de Varrimento . . . . .	44
5.2.4	Ensaio de tração . . . . .	45
5.2.5	Testes de degradação . . . . .	46
5.3	Caracterização da brushite . . . . .	50
5.3.1	Produção da brushite . . . . .	50
5.3.2	Tempo de presa . . . . .	50
5.3.3	Teste de coesão . . . . .	52
5.3.4	Difração de Raios-X . . . . .	55
5.3.5	Teste de citotoxicidade . . . . .	57
5.4	Impregnação da brushite . . . . .	60
5.4.1	Tratamento com NaOH . . . . .	61
5.4.2	Moagem dos pós . . . . .	61
5.4.3	SEM . . . . .	63
<b>6</b>	<b>Conclusão e perspectivas futuras</b>	<b>65</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>69</b>
<b>A</b>	<b>Teste de citotoxicidade</b>	<b>75</b>
<b>B</b>	<b>Gráficos do DSC</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

1.1	Representação da estrutura que suporta o dente - o periodonto, constituído pela gengiva, ligamento periodontal, cimento radicular e osso alveolar. . . . .	4
1.2	Esquema do processo de obtenção de um cimento através de uma fase sólida e líquida. . . . .	9
2.1	Esquema de uma montagem básica de eletrofição, onde está representada a seringa que contém a solução polimérica, a fonte de alta tensão e o coletor ligado à terra. . . . .	17
2.2	Montagem experimental da eletrofição com o coletor cilíndrico rotatório (à esquerda) e coletor plano (à direita). . . . .	19
2.3	Fotografia de uma amostra sujeita a um ensaio de tração: fixação da amostra pelas garras antes de iniciar o teste (à esquerda) e depois da deformação imposta à amostra durante o teste (à direita). . . . .	23
3.1	Aparelho de Vicat: em foto (à esquerda) e em esquema (à direita). . . . .	30
5.1	Imagens de microscopia ótica de deposições com diferentes concentrações de PCL em clorofórmio com os parâmetros padrão. A e B - [8%] m/m; C e D - [10%] m/m; E e F - [12%] m/m; G e H - [15%] m/m. A, C, E e G - ampliação 100x; B, D, F e H - ampliação 400x. . . . .	37
5.2	Imagens de microscopia ótica de deposições de PCL em clorofórmio sujeitas a variações de tensão. A e B - 10kV; C e D - 15 kV; E e F - 20 kV. A, C e E - ampliação 100x; B, D e F - ampliação 400x. . . . .	38
5.3	Imagens de microscopia ótica de deposições de PCL em clorofórmio sujeitas a variações de caudal. A e B - 0,2 ml/h; C e D - 0,5 ml/h; E e F - 0,8 ml/h. A, C e E - ampliação 100x; B, D e F - ampliação 400x. . . . .	38
5.4	Imagens de microscopia ótica de deposições de PCL em clorofórmio sujeitas a variações de distância agulha-coletor. A e B - 10 cm; C e D - 20 cm; E e F - 30 cm. A, C e E - ampliação 100x; B, D e F - ampliação 400x. . . . .	39
5.5	Imagens de microscopia ótica de fibras eletrofiadas de soluções, a 23% de PCL em ácido acético com diferentes concentrações de água, que não sofreram tratamento com ultra-sons . A e D - 0% H <sub>2</sub> O; B e E - 2% H <sub>2</sub> O; C e F - 4% H <sub>2</sub> O. A, B e C - ampliação 100x; D, E e F - ampliação 400x. . . . .	40

5.6	Imagens de microscopia ótica de fibras eletrofiadas de soluções, a 23% de PCL em ácido acético com diferentes concentrações de água, que sofreram tratamento com ultra-sons. G e I – 2% H <sub>2</sub> O; H e J – 4% H <sub>2</sub> O. G e H – ampliação 100x; I e J – ampliação 400x. . . . .	40
5.7	Imagem de SEM da membrana PCL23_0 e respetivo histograma relativo à dispersão dos diâmetros das fibras. . . . .	41
5.8	Imagem de SEM da membrana PCL23_2 e respetivo histograma relativo à dispersão dos diâmetros das fibras. . . . .	42
5.9	Imagem de SEM da membrana PCL23_4 e respetivo histograma relativo à dispersão dos diâmetros das fibras. . . . .	42
5.10	Imagem de SEM da membrana PCL23_4, onde se observa um padrão semelhante a “favos”. . . . .	43
5.11	Representação gráfica da análise de DSC para a amostra PCL23_0, com a indicação do valor da temperatura de fusão (61,2°C) e da área do respetivo pico (43,45 J/g) e do valor da temperatura de cristalização (37,3°C) e da área do respetivo pico (-38,87 J/g). . . . .	44
5.12	Curvas de tração típicas das membranas PCL23_0, PCL23_2 e PCL23_4. . . .	45
5.13	Representação gráfica da perda de massa (%) por degradação enzimática das membranas PCL23_0, PCL23_2 e PCL23_4, em função dos dias de exposição à enzima e ao controlo (PBS). . . . .	47
5.14	Imagens de SEM da membrana PCL23_0 submetida a teste de degradação durante 32 dias: A e B – em meio enzimático (diferentes ampliações); C – em PBS. . . . .	48
5.15	Representação gráfica da perda de massa (%) ocorrida por degradação por espécies reativas das membranas PCL23_0, PCL23_2 e PCL23_4, em função dos dias de exposição ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Tampão 5,4, KO <sub>2</sub> e NaOH. . . . .	49
5.16	Imagens de SEM da membrana PCL23_0 submetida a teste de degradação durante 32 dias: A – numa solução de peróxido de oxigénio; B – numa solução tampão 5,4; C – numa solução de hidróxido de sódio. . . . .	49
5.17	Imagens dos blocos de cimentos sujeitos ao teste de coesão e imersos durante 32 dias em PBS. Cimentos produzidos utilizando ácido cítrico 0,5M (à esquerda) e ácido málico (à direita). . . . .	53
5.18	Perda de massa dos cimentos de brushite sujeitos ao teste de coesão, durante 32 dias. . . . .	54
5.19	Difratograma dos cimentos submetidos à análise por DRX após produção e identificação dos picos característicos da brushite e MCPM. . . . .	56
5.20	Difratograma dos cimentos submetidos à análise por DRX após imersão em PBS durante 32 dias e identificação dos picos característicos da monetite. . . .	57
5.21	Imagem da placa de 96 poços utilizada no teste de citotoxicidade, com a indicação das condições testadas (ver texto anterior). . . . .	58

---

5.22	Imagens de microscópio ótico das células sujeitas a extratos da formulação PLR2_AC0,5 obtidos no período T1 (à esquerda) e no período T2 (à direita). .	59
5.23	Imagem de SEM das membranas Clor.10%. À esquerda apresenta-se a membrana sem tratamento de NaOH e à direita a membrana sujeita a tratamento com NaOH. . . . .	64
5.24	Imagem de SEM das membranas Clor.15%. À esquerda apresenta-se a membrana sem tratamento de NaOH e à direita a membrana sujeita a tratamento com NaOH . . . . .	64
B.1	Representação gráfica da análise de DSC para a amostra PCL23_2, com a indicação do valor da temperatura de fusão (61,8°C) e da área do respetivo pico (48,49 J/g), bem como da temperatura de cristalização (37,9°C) e da área do respetivo pico (-43,7 J/g). . . . .	79
B.2	Representação gráfica da análise de DSC para a amostra PCL23_4, com a indicação do valor da temperatura de fusão (62,1°C) e da área do respetivo pico (51,91 J/g), bem como da temperatura de cristalização (37,2°C) e da área do respetivo pico (-47,26 J/g). . . . .	80



## LISTA DE TABELAS

1.1	Descrição dos principais produtos comercializados de barreiras oclusivas. . .	7
1.2	Principais fosfatos de cálcios, razão em número de Ca e P na sua composição e solubilidade em água. . . . .	8
1.3	Parâmetros de produção que afetam as características dos cimentos. . . . .	10
2.1	Materiais utilizados para a produção da membrana e suas principais características. . . . .	18
2.2	Percentagem mássica de solventes nas diferentes soluções de PCL eletrofiadas.	19
2.3	Equipamento da montagem experimental de eletrofição e respetivo fabricante.	20
2.4	Composição salina do PBS <sup>++</sup> 10x . . . . .	24
3.1	Materiais utilizados para a produção da brushite . . . . .	28
5.1	Efeito dos parâmetros de produção na morfologia das fibras. . . . .	36
5.2	Diâmetro médio das fibras obtidas a partir das soluções de 23% de PCL, para 0%, 2% e 4% de H <sub>2</sub> O no solvente à base de ácido acético. . . . .	42
5.3	Porosidade das membranas PCL23_0, PCL23_2 e PCL23_4. . . . .	43
5.4	Valores da temperatura de fusão, entalpia de fusão, entalpia de cristalização e grau de cristalinidade fornecidos pela análise de DSC, das membranas PCL23_0, PCL23_2 e PCL23_4 . . . . .	44
5.5	Módulo Young, Tensão de cedência, Tensão de rutura e Deformação à rutura das membranas PCL23_0, PCL23_2 e PCL23_4. . . . .	46
5.6	Tempo de presa inicial ( <i>I</i> ) e final ( <i>F</i> ) em minutos em função da PLR para todas as formulações estudadas. . . . .	51
5.7	Diferentes formulações da fase sólida e dos aditivos dos cimentos submetidos ao teste de coesão. Cada uma destas formulações foi testada para três formulações da fase líquida: ácido cítrico 0,5 M e 1M e ácido málico 0,5 M. . .	53
5.8	Registo da perda de massa (%) ao fim de 32 dias para todas as composições e razões estudadas no teste de coesão. . . . .	55
5.9	Períodos de lixiviação empregues no teste de citotoxicidade. . . . .	58
5.10	Resultados da viabilidade celular relativa à situação do controlo negativo. . .	59
5.11	Pesagem das membranas sem qualquer tipo de tratamento antes e depois da tentativa de impregnação da brushite. . . . .	61

5.12	Pesagem das membranas sujeitas a tratamento com NaOH antes e depois da tentativa de impregnação da brushite. . . . .	61
5.13	Pesagem das membranas com e sem tratamento com NaOH antes e depois da impregnação com pós de tamanho mais reduzido e respetiva infiltração. . . .	62
5.14	Pesagem das membranas de PCL obtidas a partir de soluções de PCL dissolvido em clorofórmio tratadas com NaOH e impregnadas com pós de tamanho mais reduzido e respetiva infiltração. . . . .	63

## GLOSSÁRIO

**$\beta$ -TCP**  $\beta$ -fosfato tricálcico.

**C4S** Sulfato de condroitina.

**Ca:P** Razão molar entre os íons cálcio e potássio.

**CPC** Cimento de Fosfato de Cálcio - do inglês *Calcium Phosphate Cement*.

**DCPD** Hidrogenofosfato de cálcio di-hidratado - do inglês *Dicalcium Phosphate Dihydrate*.

**DMEM** Dulbecco's Modified Eagle's medium.

**d-PTFE** Politetrafluoretileno de elevada densidade.

**e-PTFE** Politetrafluoretileno expandido.

**ET** Engenharia de Tecidos.

**GBR** Regeneração Óssea Guiada - do inglês *Guided Bone Regeneration*.

**MCPA** Fosfato monocálcico anidro.

**MCPM** Fosfato monocálcico monohidratado.

**PCL** Policaprolactona - do inglês *Polycaprolactone*.

**PGA** Poli-(ácido glicólico).

**PLA** Poli- (ácido láctico).

**PLCL** Poli- (DL-caprolactona).

**PLR** Razão Pó/Líquido, apresentado em g/mL.

**PTFE** Politetrafluoretileno.



## INTRODUÇÃO

### 1.1 Enquadramento

A Engenharia de Tecidos (ET) é uma área que associa princípios da biologia e da engenharia com o intuito de desenvolver substitutos funcionais para tecidos danificados. O desenvolvimento destes substitutos recorre ao uso de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, por forma a não produzirem efeitos tóxicos para o organismo e virem a dar lugar a um novo tecido regenerado [1]. Processados por técnicas capazes de criar estruturas adequadas a promoverem a regeneração, novos produtos de ET têm vindo a ser desenvolvidos, como é o caso das membranas oclusivas.

Na área estomatológica, a perda de tecido ósseo é um problema para a colocação de implantes dentários. Uma das principais causas da perda de dentes em adultos é a periodontite, seguida da presença de cáries. A perda dentária pode causar problemas funcionais e estéticos significativos, com potenciais consequências psicológicas [2, 3]. A regeneração óssea é dificultada pela invasão da cavidade óssea por tecidos moles, o que compromete a osseointegração. Aquando da colocação de um implante, é necessário que haja tecido ósseo suficiente para ancorar o implante remodelando-se à sua volta. Para este fenómeno de osseointegração acontecer, o osso deve ser viável, o espaço entre o osso e o implante não pode exceder os 10 nm e não deve conter tecido fibroso [3].

A regeneração tecidual e a regeneração óssea guiada (GBR) são técnicas usadas em estomatologia no tratamento da doença periodontal e na regeneração do tecido ósseo. Empregam uma membrana oclusiva para evitar a invasão do espaço do defeito ósseo pelos tecidos epitelial e conjuntivo, conservando assim o espaço para a regeneração óssea. Este procedimento tem sido amplamente utilizado em clínicas dentárias e estabelecido

como uma técnica básica em medicina regenerativa periodontal [4, 5]. O uso de membranas oclusivas em GBR estabelece uma interface que, de um lado interage com o tecido conjuntivo e epitelial e, do outro lado, interage com o ligamento alveolar e com o tecido ósseo alveolar [2].

Atualmente, existe uma ampla gama de membranas oclusivas. As membranas não-reabsorvíveis proporcionam uma barreira biocompatível capaz de manter o espaço necessário à regeneração por tempo suficiente; o seu desempenho é previsível e são relativamente fáceis de manipular clinicamente. A sua grande desvantagem é a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para a remoção da membrana. As membranas biodegradáveis apresentam a vantagem de não necessitarem de ser removidas. Permitem uma integração tecidual e são fáceis de manipular cirurgicamente. Comparativamente às membranas não-reabsorvíveis, apresentam falhas na manutenção do espaço propício à regeneração óssea e apresentam instabilidade mecânica. As membranas de ambos os tipos disponíveis comercialmente são à base de polímeros e apresentam algumas limitações estruturais, mecânicas e/ou biofuncionais [2, 6, 7, 8]. Estudos recentes demonstraram que a integração de biocerâmicos no polímero favorece a bioatividade e confere estabilidade às membranas. Estas membranas compósitas conjugam as propriedades osteocondutoras e osteoindutoras dos fosfatos de cálcio, bem como a sua rigidez e as propriedades de degradação e elasticidade dos polímeros [9].

Nos últimos anos, a eletrofiação ganhou especial atenção para a produção de membranas para regeneração óssea guiada. A eletrofiação é uma técnica que permite a produção de fibras com diâmetros da ordem das centenas de nanómetros ou de alguns micrómetros. Estas fibras apresentam uma elevada razão área superficial/volume e a sua deposição resulta, em geral, em estruturas muito porosas, com poros de um tamanho reduzido o que permite a sua utilização como membranas capazes de garantir a oclusividade celular necessária às barreiras destinadas à GBR.

Para além dos requisitos de biocompatibilidade, fácil manipulação clínica e apropriada integração com o tecido circundante, a membrana para GBR deve garantir a manutenção do espaço necessário à regeneração óssea [6, 8, 9]. A movimentação da membrana tem uma influência negativa na formação do tecido ósseo. Assim torna-se muito importante fixar estruturalmente a membrana após a sua adaptação ao local do defeito ósseo.

Neste trabalho, pretende-se desenvolver uma membrana oclusiva biodegradável capaz de verificar os requisitos acima mencionados. Para tal, conjugar-se-á uma membrana oclusiva polimérica, produzida por eletrofiação, com uma componente cerâmica (cimento de brushite) capaz de fixar a membrana. A componente cerâmica será tal que a sua preparação e incorporação na membrana será feita pelo médico imediatamente antes da colocação desta no defeito ósseo. Esta componente deve permitir a manipulação da membrana durante a sua adaptação ao defeito para depois dar lugar a uma estrutura fixa capaz de suportar a correta formação do tecido ósseo. É de frisar que esta proposta

de trabalho inova pela escolha da componente cerâmica e pela forma como esta será incorporada na membrana polimérica.

O trabalho realizado dividiu-se nas 3 fases seguintes:

Fase 1 - Obtenção da membrana oclusiva polimérica por eletrofiação;

Fase 2 - Sintetização duma componente cerâmica que possa ser impregnada na membrana polimérica por forma a permitir a fácil adaptação desta membrana ao contorno anatómico e a sua posterior estabilização estrutural;

Fase 3 - Conjugação da membrana polimérica obtida com a componente cerâmica para obter a membrana oclusiva descrita anteriormente.

A fase 1 e 2 decorreram em simultâneo; a fase 3 foi implementada aquando da otimização da membrana polimérica e da componente cerâmica.

Relativamente à estrutura da dissertação, esta encontra-se organizada em 6 capítulos. O primeiro capítulo contempla o enquadramento do tema, onde se começa por expor a necessidade de desenvolver membranas oclusivas capazes de satisfazer as necessidades clínicas mencionadas anteriormente. De seguida, é apresentada uma breve revisão bibliográfica, onde são focados os temas importantes à interpretação do trabalho, nomeadamente a regeneração óssea guiada e membranas oclusivas e a produção da brushite, bem como as suas propriedades mais relevantes. Após a consolidação das bases teóricas, os capítulos 2, 3 e 4 descrevem as técnicas experimentais utilizadas para a produção e caracterização da fase 1, 2 e 3, respetivamente. O capítulo 5 dedica-se à apresentação e discussão dos resultados obtidos, iniciando-se com o estudo prévio da variação dos parâmetros de eletrofiação. O capítulo 6 finaliza a dissertação ao apresentar as principais conclusões a retirar deste trabalho bem como as perspetivas futuras para a continuação do mesmo.

## 1.2 Tecido ósseo

O osso alveolar faz parte de uma estrutura complexa que rodeia e suporta o dente – o periodonto (Figura 1.1). O periodonto é constituído pelos seguintes tecidos: gengiva, ligamento alveolar, cemento radicular e osso alveolar. A sua principal função é ancorar o dente ao tecido ósseo das maxilas, mantendo a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral [10].

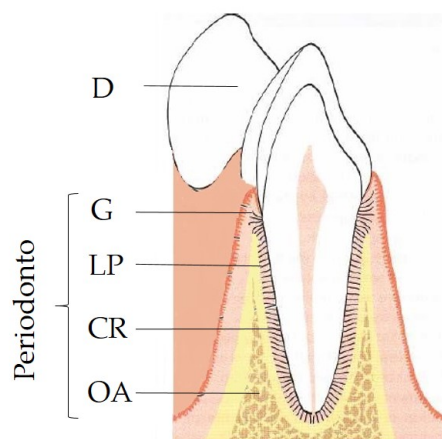


Figura 1.1: Representação da estrutura que suporta o dente (D) - o periodonto, constituído pela gengiva (G), ligamento periodontal (LP), cemento radicular (CR) e osso alveolar (OA). Adaptado: [10]

O tecido ósseo tem capacidade regenerativa e de remodelação, que se processa com maior velocidade na juventude. Essa capacidade é consequência da atividade das células ósseas: osteoblastos, responsáveis maioritariamente pela formação de novo tecido ósseo e, os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção de tecido ósseo. A produção de osso pela ação dos osteoblastos vai diminuindo progressivamente com a idade, o que leva à perda de densidade óssea [11, 12].

Adicionalmente, a perda de tecido ósseo alveolar pode estar associada a doenças bacterianas que comprometem o funcionamento normal do periodonto, como a periodontite e/ou as cáries, ou ser resultante de uma extração dentária. As zonas onde ocorre perda de tecido ósseo ficam sujeitas à invasão de tecidos moles, o que compromete a regeneração óssea e a colocação de implantes [3, 10]. A rápida reabsorção óssea impede a osseointegração e dificulta o desempenho do implante.

O suporte de um dente ou de um implante dentário requer um adequado volume de tecido ósseo alveolar. Quando esse volume é reduzido são usadas técnicas para o seu aumento baseadas no uso de enxertos, que promovem a regeneração do tecido ósseo e consequentemente o aumento do volume ósseo. A mais frequente é a regeneração óssea guiada.

## 1.3 Regeneração óssea guiada

O termo GBR foi introduzido em 1980, num estudo conduzido por Nyman e Gottlow, quando se aplicaram barreiras oclusivas em feridas periodontais para cessar a migração de células do tecido conjuntivo gengival e epitelial para o defeito periodontal. As membranas oclusivas impediam assim a invasão do defeito pelos tecidos epitelial e conjuntivo (exclusão celular), permitindo a regeneração óssea [6, 7, 8]. Em GBR a formação de novo osso é promovida preenchendo o defeito com um substituto ósseo revestido com uma membrana oclusiva semipermeável. Os materiais de preenchimento, ou enxertos de substituição óssea, podem ter origem num animal de outra espécie (xenoenxerto, geralmente de bovino), ser do próprio indivíduo (autoenxerto) ou de um indivíduo da mesma espécie (aloenxerto) [4, 7].

O sucesso da GBR é condicionado pela preservação do espaço adequado para a regeneração óssea e pela estabilidade mecânica necessária ao processo de cicatrização [7, 8].

### 1.3.1 Membranas oclusivas

As membranas oclusivas são utilizadas em implantologia para garantir a exclusão dos tecidos moles do local de crescimento ósseo. Para além da eficácia desta barreira oclusiva, a sua estabilidade, o fornecimento adequado de sangue, o acesso de células que permitam formação óssea (osteoblastos) e a técnica de cirurgia utilizada são fatores que contribuem para um resultado satisfatório da GBR [6].

As membranas oclusivas para aplicação estomatológica devem cumprir cinco critérios fundamentais, descritos pela primeira vez por Scantlebury [5, 6]:

- Biocompatibilidade – a membrana tem de proporcionar um nível aceitável de biocompatibilidade, o material utilizado não deve desencadear uma resposta imunitária.
- Oclusividade – a membrana deve atuar como uma barreira que permita excluir o acesso a células indesejáveis ao espaço de crescimento ósseo. Assim, os poros devem ser suficientemente pequenos para serem impermeáveis às células epiteliais e fibroblastos, mas devem facilitar a difusão de fluidos que transportam oxigénio, nutrientes e substâncias bioativas essenciais para a regeneração óssea.
- Integração tecidual – é essencial que o tecido hospedeiro se integre com a membrana. Neste sentido, é necessário que a membrana se ajuste ao contorno anatómico do periodonto.
- Space-making – a membrana deve ser capaz de criar e preservar um espaço que permita o crescimento do tecido a partir do ligamento periodontal durante o tempo adequado.

- Manuseamento clínico – a membrana deve possuir uma configuração e propriedades mecânicas que permitam o seu fácil manuseamento para que seja ajustada ao local de aplicação.

Atualmente, existe uma ampla gama de membranas oclusivas. Estas podem ser agrupadas de acordo com as suas características de degradação, em não-reabsorvíveis ou biodegradáveis [6].

As membranas não-reabsorvíveis são à base de politetrafluoretileno (PTFE), material conhecido por ser biocompatível e inerte. De acordo com a sua estrutura, pode dividir-se em PTFE expandido (e-PTFE) ou PTFE de elevada densidade (d-PTFE). Estudos efetuados comprovaram que o uso de membranas e-PTFE beneficia o processo de regeneração óssea [6]. As membranas e-PTFE e d-PTFE podem ser revestidas por um reforço de titânio. Estudos revelaram que o reforço origina uma capacidade regenerativa superior devido ao suporte mecânico adicional proporcionado pelo titânio [5, 7].

A necessidade da segunda cirurgia apresentada pelas membranas não-reabsorvíveis foi contornada com o desenvolvimento de membranas biodegradáveis, reduzindo assim o desconforto e custo para o paciente, eliminando potenciais complicações cirúrgicas. Contudo, a estabilidade destas membranas biodegradáveis deve manter-se pelo menos por 4-6 semanas, para que a regeneração seja bem-sucedida [2, 9].

Uma grande variedade de membranas biodegradáveis estão atualmente disponíveis. Consoante o tipo de biomaterial empregue dividem-se em membranas de colagénio (derivado de diferentes fontes animais) ou membranas de poliésteres sintéticos.

Os poliésteres sintéticos utilizados em membranas incluem o poli- (ácido láctico) (PLA), poli- (ácido glicólico) (PGA), policaprolactona (PCL) e seus copolímeros. As membranas PLA e PGA são degradadas maioritariamente via hidrólise, o que proporciona um ambiente ácido, prejudicial ao desenvolvimento ósseo [6, 7, 9]. O PCL é caracterizado por uma hidrofobia mais elevada e uma solubilidade mais lenta em água, comparativamente ao PLA, proporcionando um ambiente mais propício para a formação óssea. Um produto comercial feito à base de poli (L-caprolactona) (PLCL), denominado Vivosorb<sup>®</sup>, demonstrou ser biocompatível, oclusivo e capaz de manter o espaço necessário à regeneração [8]. Apesar das membranas de polímeros sintéticos existentes demonstrarem clinicamente resultados positivos, as suas fracas propriedades mecânicas e insuficiente capacidade de promover a regeneração óssea representam novos desafios [9].

As membranas de colagénio obtiveram grande notoriedade devido à sua excelente biocompatibilidade e afinidade celular. No entanto, apresentam limitações em termos mecânicos e instabilidade dimensional, devido à rápida taxa de degradação. O colagénio sujeito ao processo de reticulação diminui a sua taxa de biodegradação mas este procedimento está associado a uma adesão e proliferação limitada de osteoblastos [2, 13, 14].

As membranas comercializadas atualmente estão listadas na Tabela 1.1, onde está indicado o nome comercial do produto e o nome da respectiva empresa, bem como algumas das suas características – tamanho de poros, espessura no caso das membranas não-reabsorvíveis e tempo de reabsorção para as membranas biodegradáveis.

Tabela 1.1: Descrição dos principais produtos comercializados de barreiras oclusivas. Adaptado: [6,8]

Nome comercial (Descrição)	Material	Tamanho poros ( $\mu\text{m}$ )	Espessura/tempo de reabsorção
<b>Membranas não-reabsorvíveis</b>			
Gore-Tex® (W.L. Gore and Associates, Inc., Flagstaff, AZ)	e-PTFE	0,5 – 30	-
TefGen® (American Custom Medical, Inc., Lubbock, TX, USA)	d-PTFE	0,2-0,3	-
Cytoplast™ (Osteogenics Biomedical, Inc., Lubbock, TX, USA)	d-PTFE	< 0,3	150 a 250 $\mu\text{m}$
<b>Membranas biodegradáveis – materiais sintéticos</b>			
Guidor® (John O. Butler Co., Chicago, IL)	PLA	-	-
Atrisorb® (Block Drug Corporation, Jersey City, NJ)	PDLL+solvente	-	36-48 semanas
Vicryl® (Humanus Dental, AB, Malmö, SE)	PLG	-	4-12 semanas
Epi-Guide® (DSM Biomedical Headquarters, Exton, PA)	PDLLA	-	24-48 semanas
Vivosorb® (Polyganics, Groningen, NL)	PLCL	-	0,2 mm espessura; 96 semanas
<b>Membranas biodegradáveis – materiais naturais</b>			
Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, CH)	Colagénio tipo I derivado da pele porco	-	24 semanas
BioMend® (Sultzzer Calcitek Inc., Carlsbad, USA)	Colagénio tipo I derivado do tendão bovino	-	8 semanas

Apesar da diversidade de membranas existentes, é incontestável que a membrana com as características e propriedades ideais ainda permanece por descobrir.

Muitas das investigações recentes focam-se em membranas de polímeros biodegradáveis. Após a colocação a membrana deve manter-se estável para que o ambiente seja adequado à regeneração. Para garantir a imobilização das membranas são por vezes usadas suturas, parafusos e pinos ou adesivos [9, 15]. Estas soluções não são ainda satisfatórias quer pela sua ineficiência, dificuldade de aplicação ou toxicidade. Para melhorar as propriedades mecânicas das membranas têm-se incorporado fosfatos de cálcio na matriz

polimérica, tais como hidroxiapatite e fosfato tricálcico. Estudos demonstraram resultados bastante promissores, quer no melhoramento das propriedades mecânicas quer na bioatividade e proliferação dos osteoblastos [14, 16, 17].

Yang e a sua equipa produziram membranas de PCL e PCL/hidroxiapatite por eletrofição. Neste caso, as membranas com hidroxiapatite revelaram melhores propriedades mecânicas (tensão de cedência, tenacidade e ductilidade) [9]. Num estudo realizado em 2004 foram produzidas, por eletrofição, membranas de PCL e carbonato de cálcio tendo sido demonstrado que a presença de 10% carbonato de cálcio aumenta a tensão de cedência e confere maior estabilidade à membrana [18].

## 1.4 Cimentos de Fosfato de cálcio

Os fosfatos de cálcio são materiais cristalinos com composição química semelhante à fase inorgânica do osso natural presente nos tecidos ósseo e dentário, constituindo o maior grupo de biominerais presente nos animais vertebrados [19, 20]. Este facto confere-lhes alta biocompatibilidade e a capacidade de promoverem o crescimento e proliferação do osso. Desta forma, têm sido cada vez mais utilizados em aplicações biomédicas, nomeadamente em implantes ósseos e dentários. Os fosfatos de cálcio mais utilizados bem como as suas características principais encontram-se listados na Tabela 1.2. Os primeiros 5 compostos indicados na tabela são obtidos por precipitação à temperatura ambiente em soluções aquosas e, os últimos 5, são obtidos por decomposição ou síntese térmica.

Tabela 1.2: Principais fosfatos de cálcios, razão em número de Ca e P na sua composição e solubilidade em água. Adaptado: [20,21]

Composto (abreviatura) e nome mineral	Fórmula química	Ca:P	Solubilidade a 25°C, g/L
Fosfato monocalcico monohidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,50	~ 18
Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) – brushite	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1,00	~ 0,088
Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1,33	~ 0,0081
Hidroxiapatite deficiente em cálcio (CDHA)	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$	1,50-1,67	~ 0,0094
Hidroxiapatite precipitada (PHA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	~ 0,0003
Fosfato monocalcico anidro (MCPA ou MCP)	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,50	~ 17
Fosfato dicálcico anidro (DCPA ou DCP) - monetite	$CaHPO_4$	1,00	~ 0,048
$\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha - Ca_3(PO_4)_2$	1,50	~ 0,0025
$\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)	$\beta - Ca_3(PO_4)_2$	1,50	~ 0,0005
Hidroxiapatite sinterizada (HA) - hidroxiapatite	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,63	~ 0,0003

Devido às exigências atuais para materiais com diferentes propósitos, os fosfatos de cálcio comercializam-se em diversas formas: em blocos, grânulos ou cimentos [15]. Devido ao grande potencial dos cimentos de fosfato de cálcio (CPC) como materiais de reparação e regeneração óssea, ocasionalmente designam-se na literatura como cimentos ósseos de fosfato de cálcio [21].

Os CPC consistem numa mistura de um ou mais fosfatos de cálcio (geralmente, ortofosfatos de cálcio<sup>1</sup>). A mistura engloba uma fase sólida, na forma de pós, e uma fase líquida que, ao reagirem, formam uma pasta maleável que endurece espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal. O endurecimento da pasta é o resultado de um processo de dissolução e precipitação de um ou vários fosfatos de cálcio [22, 23, 24, 25]. O processo de obtenção da massa sólida, a partir da mistura da fase sólida e da fase líquida encontra-se esquematizado na Figura 1.2.

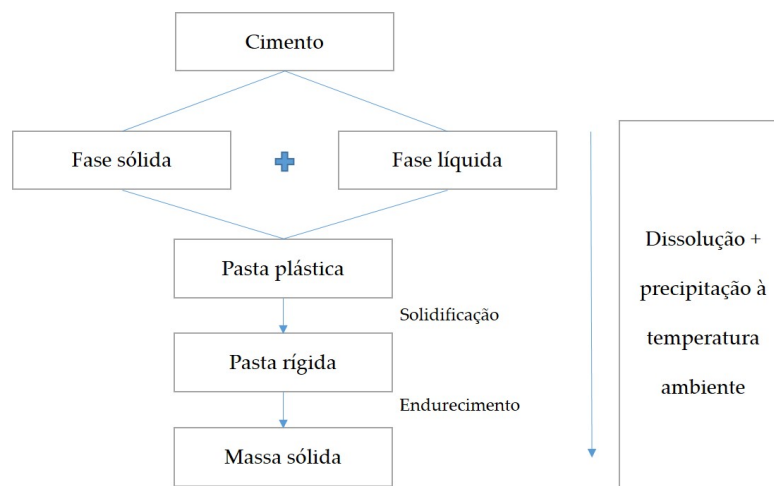


Figura 1.2: Esquema do processo de obtenção de um cimento através de uma fase sólida e líquida. Adaptado: [23]

Existem diversas formulações descritas na literatura para a produção de CPCs. No entanto, seja qual for a composição do cimento, o produto final da reação que ocorre aquando do endurecimento agrupa-se em duas categorias: brushite ou apatite, podendo esta ser hidroxiapatite ou hidroxiapatite deficiente em cálcio [23, 26]. O produto final é de grande importância porque determina a sua solubilidade final e, conseqüentemente, a reabsorção *in vivo*.

A formação da brushite e da apatite ocorrem em situações de acidez diferentes: quando o pH da solução se encontra abaixo dos 6, forma-se a brushite; caso contrário, formar-se-á apatite. Ambos os tipos de CPCs são frequentemente utilizados, apesar de a brushite ter despertado ultimamente bastante interesse. A brushite é metastável em condições fisiológicas, o que conduz a uma reabsorção mais rápida do que ocorre com a hidroxiapatite. Também a reação de endurecimento da brushite é mais rápida, o que se torna benéfico

<sup>1</sup>Nome dado aos fosfatos de cálcio que contém o grupo  $PO_4$

para aplicações em ferida aberta, embora nalgumas situações ocorra rápido demais [27, 28]. Na secção 1.4.1 será abordado como contornar este problema.

Apesar de todas as vantagens inerentes à utilização dos CPCs na regeneração óssea, ainda é necessário ajustar as características dos produtos a certos requerimentos clínicos [26]. A diversidade de fosfatos de cálcio, o vasto leque de aditivos passíveis de serem empregues e a possibilidade de controlar os parâmetros de produção, são fatores que permitem ajustar as suas propriedades. Em seguida, apresenta-se um quadro que sumariza que parâmetros de produção se podem alterar, os quais têm implicações nas propriedades dos cimentos (Tabela 1.3).

Tabela 1.3: Parâmetros de produção que afetam as características dos cimentos. Adaptado: [23]

Fase sólida	<i>Composição química</i> <i>Proporção relativa dos constituintes da mistura</i> <i>Aditivos (aceleradores/retardadores de reação, agentes coesivos)</i> <i>Tamanho das partículas</i>
Fase líquida	<i>Aditivos</i> <i>pH</i>
Mistura	<i>Razão pó/líquido</i> <i>Processo de mistura (tempo, rapidez)</i>
Factores ambientais	<i>Temperatura</i> <i>Humidade</i> <i>pH</i>

Doravante o termo CPC ou cimento referir-se-á em específico à brushite, o cimento de fosfato de cálcio empregue neste estudo.

#### 1.4.1 Brushite

A brushite ou fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) é um dos fosfatos de cálcio presentes no organismo, nomeadamente nos cálculos dentários e urinários e nos ossos em decomposição [19]. A mistura típica para obtenção dos cimentos de DCPD inclui uma componente cálcica (alcalina), uma componente fosfórica (ácida) e água, bem como aditivos. Tendo em conta que a brushite apresenta uma razão Ca:P de 1, fosfatos de cálcio com uma razão Ca:P superior podem atuar como componente alcalina [22, 26]. O argumento inverso aplica-se à componente ácida de fósforo. Vide Tabela 1.2 para consultar Ca:P dos diferentes fosfatos de cálcio.

Componente alcalina

O fosfato tetracálcico apresenta uma razão Ca:P de 2 e, como tal, pode ser usado como componente alcalina para a produção da brushite. No entanto, a sua dissolução (para obtenção dos iões  $\text{Ca}^{2+}$ ) requer demasiada energia. O composto de utilização mais comum como componente alcalina na produção da brushite é o fosfato tricálcico (TCP). O  $\beta$ -TCP é preferível ao  $\alpha$ -TCP porque a sua dissolução requer menos energia [22].

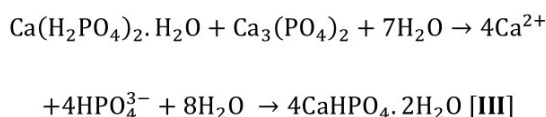
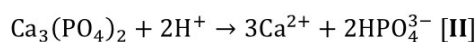
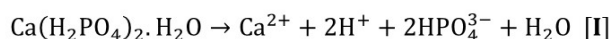
Componente ácida

O ácido fosfórico tem sido utilizado em diversas formulações para a produção da brushite por ser um composto de custo reduzido. No entanto, o fosfato monocálcico monohidratado (MCPM) e o fosfato monocálcico anidro (MCPA) proporcionam a obtenção de cimentos com melhores propriedades de manuseamento, o que os torna a opção mais adequada na maioria das situações. A presença de uma molécula de água no MCPM facilita a reação de endurecimento da qual resultam cimentos com melhores propriedades do que os obtidos a partir do MCPA [22].

A reação de formação da brushite divide-se em 4 fases principais:

1. Dissolução da fase sólida no solvente utilizado
2. Formação de uma pasta saturada
3. Nucleação da pasta saturada
4. Formação de um sólido com cristais interligados derivado da cristalização

Neste trabalho, utilizou-se o conjunto precursor  $\beta$ -TCP/MCPM. A correspondente reação ácido-base (equação [III]) de formação da brushite pode ser dividida em duas fases (equações [I] e [II]).



A reação inicia-se com a dissolução do MCPM em água que resulta numa diminuição significativa do pH. Devido à presença de água, ocorre uma reação endotérmica (equação [I]) onde o MCPM tende a hidrolisar originando iões fosfato e cálcio. Simultaneamente,

o carácter ácido da solução provoca a dissolução do  $\beta$ -TCP, através de uma reação exotérmica (equação [II]). O aumento do pH nesta fase da reação resulta da precipitação dos cristais da brushite (equação [III]). Após a reação, o pH do cimento varia lentamente aproximando-se de um valor neutro [22, 23, 26]. O processo pode ser modificado na presença de aditivos que afetam a dissolução dos reagentes, a precipitação dos cristais da brushite ou ambos. De seguida, discutiremos mais detalhadamente este assunto.

#### 1.4.1.1 Parâmetros de produção

Dada a necessidade de controlar certas características da brushite tais como: o tempo de presa, o carácter ácido, a coesão e as propriedades mecânicas, torna-se crucial avaliar a correlação dos parâmetros de síntese com estas características. Desta forma, apresentam-se de seguida as estratégias usadas para efetuar esse controlo tendo em conta as propriedades pretendidas.

##### Tempo de presa

O interesse crescente nos CPCs prende-se com a facilidade de manuseamento na prática clínica. Assim, a reação de formação deve prolongar-se o suficiente para permitir ao médico moldar o material, mas não demasiado por forma a comprometer a saúde do paciente [29].

Para caracterizar no tempo o processo de formação da brushite definem-se vários tempos. O tempo de mistura é o tempo necessário à mistura das fases líquida e sólida. O tempo de presa inicial ( $I$ ) é o tempo que decorre entre o início da mistura até ao tempo de manipulação. O tempo de manipulação corresponde à janela temporal de oportunidade para moldar o material. O tempo de coesão ( $CT$ ) é definido pela altura a partir da qual se pode emergir o cimento numa solução de Ringer sem que ocorra a sua desintegração. A mistura endurece ao longo do tempo até ser atingido o tempo de presa final ( $F$ ), ou simplesmente tempo de presa, que é assim o tempo ao fim do qual o endurecimento do material é completo [26].

O cimento não deve ser manipulado entre os tempos  $I$  e  $F$ . Os requisitos para os tempos atrás definidos foram estabelecidos com base na experiência clínica de utilização do material [21]:

$$3 \leq I < 8,$$

$$I - CT \geq 1,$$

$$F \leq 15,$$

onde todos os tempos estão indicados em minutos.

Para aplicações dentárias recomenda-se que  $I$  se aproxime mais dos 3 minutos. No entanto, em situação alguma se aceitará  $F$  maior do que 15 minutos [21, 26].

Por norma, a brushite exibe um tempo de presa muito curto. Diversos parâmetros de produção podem ser usados para o controlar: razão pó/líquido, tamanho das partículas, modificações iónicas e aditivos (retardadores se aumentarem o tempo de presa e aceleradores se diminuïrem o tempo de presa). Quanto maior a proporção pó/líquido (PLR), menor o tempo necessário para o cimento endurecer. O uso de pós com tamanhos mais reduzidos também encurta o tempo de presa [23]. A presença de iões sulfato, citrato ou pirofosfato inibe a cristalização e, por conseguinte, a precipitação de brushite, resultando num aumento do tempo de endurecimento. Foi identificado que o efeito dos iões sulfato depende da concentração utilizada: o tempo de presa só aumenta se a concentração for pequena (menor que 0,1 M); concentrações elevadas resultam na formação de cristais de sulfato de cálcio dihidratado, o que promove um decréscimo no tempo de reação [22, 30]. Os pirofosfatos de cálcio e sódio são os sais mais utilizados para a disponibilização de iões pirofosfato visando aumentar o tempo de presa da brushite [22, 31].

A adição de sulfato de condroitina (C4S), um glicosaminoglicano, também influencia o tempo de presa de uma forma que depende da concentração: baixas concentrações de C4S (1-8%) aumentam o tempo de endurecimento do cimento, enquanto concentrações maiores que 10% diminuem o tempo de endurecimento [25].

A adição à fase líquida de um ácido carboxílico, tal como o tartárico, glicólico, málico e em especial o cítrico, tem um efeito inibitório da reação da brushite, sendo portanto considerados retardadores [22, 31].

### Coesão

A coesão pode ser definida como a capacidade que o material tem de não se desintegrar quando em contacto com fluidos. A sua avaliação é feita pela quantidade de partículas libertadas pelo cimento antes do tempo final de presa [31, 32]. O controlo desta característica é de extrema importância quando a aplicação visa regiões altamente vascularizadas – a desagregação de partículas de CPC para a corrente sanguínea pode desencadear reações inflamatórias e embolias pulmonares [23].

Bohner *et al.* [30] demonstraram que uma redução do tamanho das partículas ou a adição de um hidrogel, que aumente a viscosidade da fase líquida, são as melhores formas de assegurar uma boa coesão do cimento. Em alguns casos, estas soluções modificaram e comprometeram as propriedades mecânicas e o tempo de presa [33].

Outra estratégia interessante é a incorporação de aditivos que promovem a coesão, como é o caso dos polímeros hidrofílicos – ácido hialurónico, hidroxipropilmetilcelulose e ácido poliacrílico. O polietilenoglicol (PEG) aumenta a coesão do cimento, mas influencia o tempo de presa [34, 35].

### Propriedades mecânicas

Idealmente, os cimentos para regeneração do tecido ósseo deveriam ter propriedades mecânicas similares às do osso. As propriedades mecânicas são influenciadas pela microestrutura do material onde se incluem a porosidade e o tamanho, morfologia e distribuição dos cristais formados [22]. As propriedades mecânicas variam com os seguintes fatores:

1. Porosidade – a resistência da brushite decresce quase linearmente com o aumento da porosidade [11];
2. Razão pó-líquido (PLR) – por um lado, uma baixa PLR significa excesso de água na reação, o que resulta num aumento da porosidade e conseqüentemente piores propriedades mecânicas; por outro lado, uma PLR demasiado elevada resulta num cimento pouco fluído e de difícil manipulação [26] ;
3. Tamanho das partículas – partículas mais pequenas originam cimentos com esforços de compressão mais elevados [33];
4. Presença de aditivos:
  - Pirofosfato e ácidos carboxílicos, tais como os ácidos cítrico e málico, facilitam a mistura das duas fases, resultando em melhores propriedades mecânicas; concentrações de ácido elevadas (maior que 1 M) têm o efeito contrário [22];
  - Polímeros hidrofílicos como o C4S demonstraram efeitos benéficos nas propriedades mecânicas [25];
  - Certas proteínas como a albumina e fibrinogénio pioram as propriedades mecânicas porque interferem com as interações cristal-cristal [22, 36].
5. Incorporação da brushite em fibras – várias fibras têm sido incorporadas com o intuito de reforçar os CPCs. Entre as fibras reabsorvíveis, a utilização de PLA, PLGA e PCL encontra-se descrita na literatura [26].

Engstrand *et. al* estudaram o efeito da variação de vários parâmetros: PLR, tamanho das partículas do MCPM e o uso de retardantes. Concluíram que as condições que produziram um CPC com o esforço de compressão mais elevado e melhores propriedades mecânicas foram: PLR baixa (1 g/mL), partículas de MCPM de tamanho mais reduzido (90% das partículas menores que 200  $\mu\text{m}$ ) e o uso de uma concentração de ácido cítrico de 0,5M [33].

Desta forma, conclui-se que para obter um cimento com propriedades adequadas para uma aplicação em concreto, é necessário conjugar vários parâmetros. Neste estudo em particular, testou-se o efeito de diversas formulações nas características da brushite.

## MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA

A primeira parte do capítulo 2 apresenta os materiais utilizados e o processo de eletrofição, técnica empregue para a obtenção da membrana oclusiva. De seguida, descrevem-se todos os procedimentos de produção e de caracterização da membrana em estudo.

### 2.1 Materiais

Para a produção da membrana oclusiva, escolheu-se o biopolímero policaprolactona, um polímero que já se revelou interessante para a produção de matrizes para ET.

O PCL pertence à família dos poliésteres alifáticos. É um polímero sintético obtido por polimerização de monómeros resultantes da abertura do anel do monómero cíclico *ε*-caprolactona [37]. É biodegradável e semi-cristalino com uma temperatura de transição vítrea de cerca de  $-60^{\circ}\text{C}$  e uma temperatura de fusão entre os  $59-64^{\circ}\text{C}$  [38]. O peso molecular do PCL normalmente varia entre 3000 e 80 000 g/mol e, por sua vez, a cristalinidade do polímero tende a variar inversamente com o peso molecular [39, 40, 41].

O PCL apresenta uma taxa de degradação lenta, bem como outras propriedades adequadas para a produção de implantes de longa duração. O crescente interesse no PCL está relacionado com o baixo custo, propriedades mecânicas específicas (como um baixo módulo de Young e valores elevados de extensão à rutura) e com o facto de ser não-imunogénico e reabsorvível num espaço de tempo adequado para aplicações na área da odontologia [39, 42].

A principal desvantagem deste polímero é o seu carácter hidrofóbico que dificulta a molhabilidade. Na literatura, são descritas algumas abordagens para alterar a hidrofobicidade através de técnicas de modificação da superfície: tratamento com plasma, associar ao polímero componentes biologicamente ativas (tais como proteínas da matriz extracelular)

ou efetuar tratamento com um reagente alcalino [38]. Esta última técnica será descrita com mais detalhe posteriormente visto que foi necessário modificar a superfície do PCL por forma a conseguir uma melhor incorporação da brushite na membrana de PCL. O facto de ser hidrofóbico e semi-cristalino confere-lhe uma taxa de degradação lenta. O tempo de degradação observado *in vivo* varia aproximadamente entre 2 a 4 anos, dependendo do valor inicial do peso molecular do implante ou dispositivo [40, 43]. Em condições fisiológicas é degradado pela hidrólise das ligações éster. A degradação pode, no entanto, também ocorrer por ação enzimática [44].

Os solventes utilizados para produzir soluções de PCL eletrofiáveis para dissolver o PCL incluem o clorofórmio, o diclorometano, a acetona e hexafluoroisopropanol. O ácido acético glacial demonstrou igualmente bons resultados [45].

## 2.2 Electrofiação

A técnica escolhida para a produção das membranas oclusivas, a eletrofiação, tem ganho bastante atenção nos últimos anos. Como referido na secção 1.1, as membranas poliméricas eletrofiadas são altamente porosas e os poros, de reduzida dimensão, dificilmente permitem a infiltração celular estabelecendo uma barreira oclusiva, ao mesmo tempo que permitem a passagem das substâncias bioativas necessárias.

A eletrofiação é um método relativamente simples e de baixo custo de produção de fibras poliméricas com diâmetros submicrométricos, com uma grande razão área superficial/volume [46, 47]. Este método envolve a dissolução de um polímero, natural ou sintético, num solvente volátil e a aplicação de uma alta tensão (cerca de 10-20 kV) a um capilar por onde se ejeta a solução para uma região onde existe um campo elétrico.

Dentro de certos limites, é possível controlar a estrutura da matriz de fibras que se depositam num coletor ligado à terra, controlando alguns parâmetros quer da solução, quer do processo, quer ambientais. Fibras depositadas aleatoriamente originam matrizes semelhantes à matriz extracelular de alguns tecidos. As propriedades mecânicas das matrizes de fibras eletrofiadas dependem não só do seu material mas também das condições de processamento e da estrutura obtida [42, 47, 48].

Existem diferentes configurações de montagens de eletrofiação, mas uma das mais básicas é exemplificada na Figura 2.1. Em suma, possui uma seringa com uma agulha metálica, que contém a solução polimérica, uma bomba infusora, uma fonte de alta tensão e um coletor metálico ligado à terra. A bomba infusora permite controlar o caudal da solução ejetada da seringa. A agulha da seringa normalmente serve como um eléctrodo positivo por ligação à fonte que também é responsável por carregar eletricamente a solução polimérica. O coletor encontra-se ligado à terra por forma a atrair as fibras [37, 47].

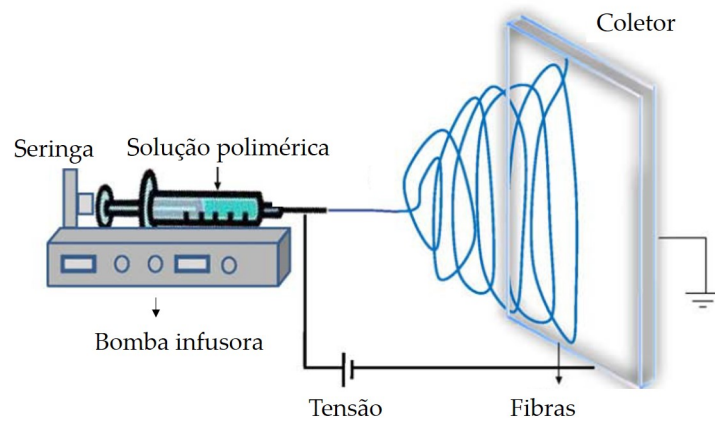


Figura 2.1: Esquema de uma montagem básica de eletrospinning, onde está representada a seringa que contém a solução polimérica, a fonte de alta tensão e o coletor ligado à terra. Adaptado: [49]

Sob a influência de um campo eletrostático forte, são induzidas cargas na solução e o polímero carregado é acelerado em direção ao coletor. Quando o campo eletrostático na ponta da agulha é fraco, a gota que aí surge não é ejetada devido à tensão superficial da solução. À medida que a intensidade do campo elétrico aumenta, a força eletrostática causa o estiramento da gota que adquire uma forma cônica (cone de Taylor) [47, 48]. Quando a tensão superficial é superada irrompe da gota um jato polimérico.

As características das nanofibras produzidas dependem das propriedades das soluções poliméricas utilizadas, bem como dos parâmetros estabelecidos para o processo. Relativamente aos parâmetros do processo que afetam a morfologia das fibras pode-se enumerar a velocidade de ejeção, a tensão aplicada, a distância entre a ponta da seringa e o tipo de coletor utilizado; existem também parâmetros ambientais que influenciam a fiação, tais como a temperatura e a humidade [49].

### 2.2.1 Preparação das soluções

As membranas de PCL foram produzidas com 2 solventes diferentes: clorofórmio e ácido acético glacial. O polímero e os solventes utilizados para a produção da membrana estão apresentados na Tabela 2.1. Todos os materiais foram usados como recebidos. As concentrações indicadas das soluções eletrofiadas, correspondem à percentagem de massa do polímero/solvente relativamente à massa total da solução. Caso contrário, será indicado o seu significado.

Tabela 2.1: Materiais utilizados para a produção da membrana e suas principais características.

	PCL	Clorofórmio	Ácido acético glacial
<b>Fornecedor</b>	Sigma-Aldrich	Carlo Erba Reagents	Scharlau
<b>Massa (g/mol)</b>	70.000-90.000	119	60,05
<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1,145	1,479 – 1,483	1,05
<b>CAS</b>	24980-41-4	67-66-3	64-19-7

#### Soluções de PCL e clorofórmio

As soluções foram preparadas adicionando o PCL ao clorofórmio e posteriormente colocadas no agitador magnético, durante 24h para garantir a dissolução completa e a boa homogeneidade da mistura. Para facilitar a identificação das soluções, usa-se uma nomenclatura que expressa a percentagem de PCL na solução: Clor. 8%, Clor. 10%, Clor. 12% e Clor. 15%.

#### Soluções de PCL e ácido acético glacial

As soluções com ácido acético foram produzidas com uma concentração de polímero de 23% e nelas foi incorporada água Millipore para estudar a sua influência na morfologia das fibras. A mistura dos componentes da solução foi feita pela seguinte ordem: água Millipore, ácido acético glacial e PCL. Estudou-se a adição de água entre 0 e 10%, em intervalos de 2%, mas apenas as soluções até 4% de água se mostraram adequadas ao objetivo, como demonstrado posteriormente. Tal como anteriormente, as soluções foram colocadas no agitador magnético durante 24h. Posteriormente, foram tratadas num banho de ultrassons sempre que necessário (conforme indicado posteriormente na secção 5.1).

A nomenclatura usada para estas soluções especifica a percentagem de água na mistura dos componentes da solução: PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4.

O resumo da constituição dos solventes das diferentes soluções de PCL testadas encontra-se na Tabela 2.2. Aí as percentagens indicadas representam a fração mássica de cada solvente para o total de componentes da solução. A concentração de PCL utilizada é omitida porque corresponde à diferença entre 100 e a soma das percentagens de solventes utilizados.

Tabela 2.2: Percentagem mássica de solventes nas diferentes soluções de PCL eletrofiadas.

Designação	Solventes utilizados (% m/m)		
	Clorofórmio (%)	Ácido acético (%)	Água (%)
Clor.8%	92	-	-
Clor.10%	90	-	-
Clor.12%	88	-	-
Clor.15%	85	-	-
PCL_0	-	77	0
PCL_2	-	75	2
PCL_4	-	73	4

### 2.2.2 Montagem experimental

No desenrolar do estudo, foram utilizadas duas configurações diferentes do sistema de eletrofição que diferem no coletor utilizado: coletor plano e coletor cilíndrico rotatório. O coletor plano foi utilizado para estabelecimento dos parâmetros de eletrofição bem como na obtenção das deposições utilizadas nos testes de degradação. As restantes deposições foram efetuadas no coletor rotatório para uniformizar a distribuição espacial das fibras. Na figura 2.2 mostram-se os dois sistemas utilizados.

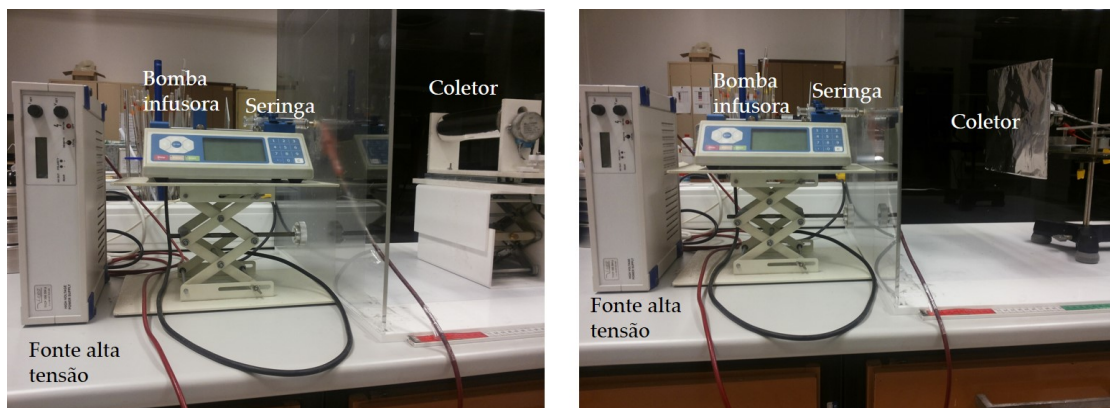


Figura 2.2: Montagem experimental da eletrofição com o coletor cilíndrico rotatório (à esquerda) e coletor plano (à direita).

Por observação da figura 2.2, podemos identificar em cada montagem os componentes de um sistema básico de eletrofição apresentados na seção 2.2. Ambos os coletores estão acoplados a um sistema mecânico que permite o estabelecimento de movimentos lentos de rotação e translação para uniformização das deposições. O equipamento comum utilizado em ambas as montagens experimentais encontra-se descrito na Tabela 2.3:

Tabela 2.3: Equipamento da montagem experimental de eletrofiação e respectivo fabricante.

Equipamento	Fabricante – especificações
Fonte alta tensão	Construída no laboratório
Bomba infusora	Chemyx – Modelo Fusion 100
Coletor	Construído no laboratório
Seringa graduada 10 mL	Ruthe® da Normax, $\varnothing_{\text{interno}} = 14,70$ mm
Agulha	Calibre 23 G

### 2.2.3 Procedimento experimental

Depois de introduzir a solução polimérica na seringa, conecta-se na sua extremidade o capilar metálico (agulha) e coloca-se o conjunto na bomba infusora, selecionando o caudal pretendido. Liga-se à agulha o crocodilo existente na extremidade do cabo que liga à saída da fonte para assim aplicar a diferença de potencial entre a agulha e o coletor que se coloca à terra. Estabelece-se a distância agulha-coletor pretendida e liga-se o sistema que permite a rotação e translação do coletor, caso seja necessário. Por último, liga-se a fonte de alta tensão onde se seleciona o potencial a aplicar. A eletrofiação decorreu num ambiente de temperatura e humidade controladas (temperatura ambiente e humidade relativa de 50-60%).

Para a produção da membrana oclusiva, foram testadas diversas soluções e parâmetros de eletrofiação a fim de verificar quais as alterações sofridas na morfologia das fibras. Esta análise foi realizada recorrendo ao microscópio ótico (VWR Visicam 3.0) que se encontra no laboratório. Inicialmente, começou-se por eletrofiar soluções de PCL em clorofórmio e, posteriormente, para tentar aproximar as características das matrizes obtidas às características desejáveis na membrana, eletrofiaram-se soluções de PCL dissolvido em ácido acético e água. Os parâmetros variados e ajustados em ambos os casos foram: a concentração da solução polimérica, o caudal imposto à solução, a distância agulha-coletor e tensão aplicada.

## 2.3 Métodos experimentais

Para a caracterização das membranas produzidas por eletrofiação estudou-se a morfologia e testaram-se algumas das suas propriedades físico-químicas como a seguir se descreve.

### 2.3.1 Caracterização morfológica

Para avaliar a morfologia das fibras recorreu-se à Microscopia Eletrónica de Varrimento e calculou-se a porosidade.

### 2.3.1.1 Microscopia Electrónica de Varrimento

A Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) permite obter imagens de amostras condutoras numa gama de ampliação extraordinariamente grande graças ao seu poder de resolução. O princípio de funcionamento baseia-se na construção de uma imagem a partir da deteção e amplificação de sinais correspondentes à emissão de eletrões, secundários ou retrodispersos, que resultam da interação de um feixe de eletrões que se faz incidir na amostra-alvo.

As amostras a testar foram fixadas num suporte metálico recorrendo a uma fita de dupla face de carbono. Seguidamente, estas são pulverizadas com uma fina camada de ouro com o objetivo de melhorar a condutividade das amostras e consequentemente o contraste da imagem.

O SEM foi feito num equipamento Zeiss Auriga (CENIMAT/I3N).

### 2.3.1.2 Porosidade

A porosidade ( $P$ ) quantifica os espaços vazios existentes na membrana. Por definição, é a razão entre o volume vazio e o volume total que a membrana aparenta ocupar. Esta razão pode ser obtida em termos percentuais pela seguinte equação:

$$P = \left(1 - \frac{\rho_{\text{aparente}}}{\rho_{\text{PCL}}}\right) \times 100\% \quad (2.1)$$

Onde,  $\rho_{\text{aparente}}$  representa a densidade aparente da membrana, calculada através do quociente entre a massa e o volume aparente da amostra e  $\rho_{\text{PCL}}$  a densidade do material denso utilizado, neste caso o PCL.

Para medir a porosidade, foram recortadas 3 amostras de cada tipo de deposição com 1 cm de largura e 3 cm de comprimento. Pesou-se cada amostra numa balança de resolução 0,1 mg e a espessura foi medida recorrendo ao micrómetro digital de resolução 10  $\mu\text{m}$  (*Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japan*) em 3 pontos diferentes de cada amostra. O valor final indicado para a porosidade corresponde à média  $\pm$  desvio-padrão.

### 2.3.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento

A Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) é uma técnica de análise térmica que determina o fluxo de calor nas amostras em estudo em função da temperatura. As variações de temperatura entre a amostra a analisar e a amostra de referência são registadas à medida que ambas são submetidas ao mesmo programa de aquecimento ou arrefecimento, a uma velocidade constante.

Os dados fornecidos pelo DSC permitem obter informações referentes a alterações na amostra que decorrem de processos endotérmicos e exotérmicos. Neste trabalho, utilizou-se esta técnica para calcular o grau de cristalinidade das membranas eletrofiadas a partir de soluções de ácido acético com e sem água. O grau de cristalinidade -  $\%$ (*cristalinidade*)

- representa a percentagem de teor cristalino de um material semi-cristalino e obtém-se pela seguinte expressão [50, 51]:

$$\%(cristalinidade) = \left( \frac{\Delta H_f(T_f) - \Delta H_c(T_c)}{\Delta H_f^\circ(T_f^\circ)} \right) \times 100\% \quad (2.2)$$

Onde,  $\Delta H_f(T_f)$  representa a entalpia medida por DSC no ponto de fusão  $T_f$ ,  $\Delta H_c(T_c)$  representa a entalpia medida por DSC no ponto de cristalização  $T_c$  e  $H_f^\circ(T_f^\circ)$  representa o valor teórico da entalpia de fusão do polímero no seu estado totalmente cristalino. No caso do PCL, este valor está referido na literatura como 139,5 J/g [52].

Os ensaios realizaram-se no Cenimat/I3N, no equipamento NETZSCH STA 449F3. As amostras foram expostas a uma gama de temperaturas entre 20 a 100°C com uma rampa de aquecimento de 5 C°/min.

### 2.3.3 Ensaios de tração

Para averiguar as propriedades mecânicas e perceber se estas dependem da quantidade de água presente na solução à base de ácido acético e a partir das quais foram eletrofiadas as matrizes, foram submetidas a testes de tração as amostras PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4.

Os testes de tração consistem na aplicação gradativa de uma deformação uniaxial, o que provoca uma tensão variável na amostra [53]. A tensão,  $\sigma$ , é o quociente entre a carga ou força uniaxial aplicada à amostra ( $F$ ) numa determinada secção de material perpendicularmente à mesma:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (2.3)$$

onde  $A$  representa a área da secção antes da aplicação da carga. Assim, esta grandeza é expressa no sistema internacional de unidades em Pa.

A deformação ou extensão,  $\varepsilon$ , define-se como o quociente entre o alongamento do material ( $\Delta l$ ) e o seu comprimento inicial ( $l_0$ ):

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (2.4)$$

Numa curva típica da tração (gráfico da tensão em função da deformação) distinguem-se duas zonas: uma zona elástica e uma zona plástica. A zona elástica caracteriza-se por uma deformação do material diretamente proporcional à tensão, bem descrito pela Lei de Hooke:  $\sigma = E \times \varepsilon$ . O módulo de Young ou módulo de elasticidade,  $E$ , corresponde ao declive da zona linear e permite aferir sobre a rigidez do material. Na zona plástica, o regime de deformação é permanente mesmo quando se cessa a aplicação de carga [53].

Os ensaios de tração decorreram no laboratório de Materiais Poliméricos, recorrendo a uma máquina de tração (*Rheometric Scientific*) com uma célula de carga de 20N, controlada

pelo *software* MINIMAT. As amostras testadas, com dimensões de 1 cm x 3 cm e espessuras variadas ( $150 \pm 25 \mu\text{m}$ ), foram fixas pelas garras por forma a estabelecer um valor de  $l_0$ , de 1 cm. A velocidade da deformação imposta foi de 2 mm/min. Foram testadas 10 amostras de 3 deposições, num total de 30 ensaios válidos para cada condição. Os dados de força e alongamento registados pelo *software* para cada amostra foram convertidos em gráficos de tensão vs. deformação, utilizando as equações 2.3 e 2.4. A Figura 2.3 mostra a montagem de uma amostra no aparelho de tração e a sua deformação.

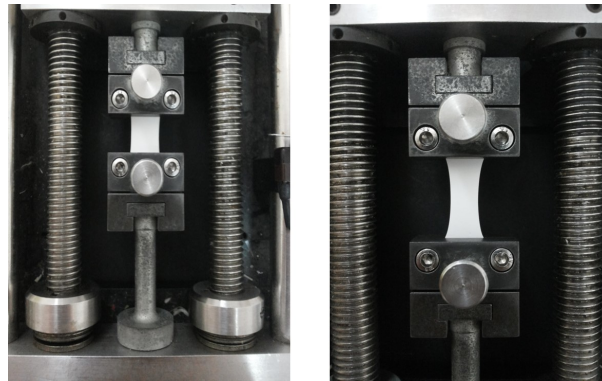


Figura 2.3: Fotografia de uma amostra sujeita a um ensaio de tração: fixação da amostra pelas garras antes de iniciar o teste (à esquerda) e depois da deformação imposta à amostra durante o teste (à direita).

Os valores do módulo de Young, tensão de cedência e tensão de rutura foram determinados para cada condição pela média dos valores obtidos para as 30 réplicas e apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio-padrão.

#### 2.3.4 Testes de degradação

A biodegradação é um aspeto importante da membrana, como mencionado anteriormente, mas a taxa de degradação deve ser adequada ao tempo de regeneração do tecido ósseo.

Com o intuito de mimetizar as condições a que o ambiente oral está sujeito, foram realizados 2 testes de degradação que mimetizam ambientes fisiológicos diferentes: degradação enzimática e degradação por espécies reativas de oxigénio. Para ambos os casos, foram recortadas amostras com cerca de  $(25 \pm 5)$  mg que depois foram colocadas em frascos contendo 5 mL de uma solução adequada. Os frascos foram colocados numa estufa a  $37^\circ\text{C}$ , onde permaneceram durante o decorrer da experiência. Para cada condição testaram-se 3 réplicas.

##### 2.3.4.1 Degradação enzimática

Para o estudo da degradação enzimática utilizou-se uma lípase e uma solução tampão fosfato-salino (PBS, Phosphahte Buffer Solution) como controlo. O PBS é uma solução salina que simula a composição iónica do plasma sanguíneo.

Preparação das soluções

A enzima utilizada (Lipase PS “*Amano*” SD) foi diluída numa concentração de 50 mg/L de PBS. O PBS empregue nos testes de degradação contém cloreto de cálcio e magnésio, designando-se por PBS<sup>++</sup> e foi preparado segundo o protocolo indicado na referência [54]. A solução *stock* foi preparada com uma concentração de 10x. As concentrações dos sais utilizados na sua preparação estão indicadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Composição salina do PBS<sup>++</sup> 10x

Sal	Massa molecular (g/mL)	Concentração (mg/L)
CaCl <sub>2</sub>	111	100
MgCl <sub>2</sub>	95,2	46,8
KCl	75	200
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136	200
NaCl	58	8000
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	268	2160

Para obter a solução usada nos testes, misturam-se 100 mL da solução *stock* com água Millipore até perfazer 1L.

Manutenção do meio

Para evitar o desenvolvimento de microrganismos, procedeu-se a mudanças de meio. Para tal, aspirou-se o meio, lavaram-se as membranas com água destilada e posteriormente com água ultrapura e colocou-se o novo meio. A solução com a enzima necessita de ser mudada de 2 em 2 dias. O PBS foi trocado quando se coloca a membrana a secar aquando das avaliações da perda de massa.

Perda de massa

A taxa de degradação das membranas é avaliada pela perda de massa (*PM*) das mesmas. Para a determinação da perda percentual de massa, pesou-se cada amostra em teste antes de ser colocada no meio ( $m_i$ ) e depois de cada pesagem ( $m_f$ ) e calculou-se:

$$\%PM = \left( \frac{m_i - m_f}{m_f} \right) \times 100\% \quad (2.5)$$

A perda de massa foi medida após os seguintes períodos de imersão: 2, 4, 8, 16 e 32 dias. Para se proceder à pesagem de massa que a amostra ainda retém, aspira-se o meio, lava-se cuidadosamente com água destilada e água ultrapura e a membrana fica a secar na estufa durante 24h, a 37°C.

**2.3.4.2 Degradação por espécies reativas**

Na degradação por espécies reativas foram testadas 4 condições: dióxido de potássio (KO<sub>2</sub>), hidróxido de sódio (NaOH), peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e tampão 5,4.

#### Preparação das soluções

- NaOH (Sigma-Aldrich) a 0,01 M
- KO<sub>2</sub> (Azko Chemicals) a 0,1 M diluído a partir de NaOH a 0,01M
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (VWR Chemicals) a 10%
- Solução tampão 5,4: obtido segundo o protocolo descrito em [55]. Resumindo, mistura-se 5,25 mL de de ácido acético a 0,1M, 19,75mL de acetato a 0,1M e água Millipore até perfazer 50 mL de solução.

#### Manutenção do meio

O procedimento é semelhante ao descrito para a degradação enzimática, excetuando a necessidade de mudança de meio: o meio KO<sub>2</sub> necessita de ser mudado diariamente e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2 em 2 dias. Os respetivos controlos, NaOH e tampão 5,4, não necessitam de ser mudados.

#### Perda de massa

Ver o procedimento descrito na secção anterior, no item perda de massa.



## MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BRUSHITE

O capítulo 3 começa por apresentar os materiais utilizados na produção do cimento de brushite e, seguidamente, os métodos da caracterização efetuada para avaliar as propriedades da brushite obtida em diferentes condições. Estes métodos visam caracterizar o tempo de presa do cimento em função da variação de vários parâmetros, nomeadamente a PLR e a influência de aditivos.

### 3.1 Materiais

Para a síntese da brushite usou-se o sistema  $\beta$ -TCP/MCPM que, na literatura, é descrito como a principal formulação para a obtenção deste cimento. Testou-se igualmente a influência da utilização de dois ácidos retardadores na fase líquida (ácido cítrico e ácido málico) e da utilização dos aditivos PEG e pirofosfato.

O trifosfato de cálcio (TCP) assume 3 fases polimorfas:  $\beta$ -TCP,  $\alpha$ -TCP e  $\alpha'$ -TCP. As últimas duas formam-se a altas temperaturas. O  $\beta$ -TCP é a fase mais estável e menos solúvel em soluções aquosas. Para temperaturas superiores a 1125 °C, o  $\beta$ -TCP transforma-se numa das fases polimorfas de alta temperatura.

Os fosfatos de monocálcio, MCPM e o MCPA são os fosfatos de cálcio mais ácidos e solúveis em soluções aquosas. Devido à sua acidez não podem ser utilizados isoladamente em aplicações biomédicas, mas quando conjugados com outros fosfatos de cálcio podem ser adequadamente utilizados nestas aplicações. Para temperaturas superiores a 100°C, o MCPM liberta uma molécula de água e transforma-se em MCPA.

O óxido de polietileno ou polietilenoglicol é um poliéster sintético solúvel em água. A sigla PEO é geralmente usada para referir o polímero de elevado peso molecular e PEG para os pesos moleculares mais baixos. O polímero é obtido numa reação de polimerização

de monómeros de óxido de etileno catalisada por catalisadores ácidos ou básicos. Neste estudo foi utilizado PEG como aditivo que promove a coesão do cimento.

O pirofosfato de cálcio, de forma química  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , é um sal insolúvel em água e solúvel em ácidos. Foi utilizado para avaliar a sua influência no tempo de presa.

## 3.2 Produção da brushite

Como foi descrito na secção 1.4, a formação do cimento de brushite compreende duas fases: uma sólida e uma líquida. Na tabela 3.1 encontra-se os materiais utilizados para a produção da brushite.

Tabela 3.1: Materiais utilizados para a produção da brushite

Materiais	Marca	Massa molar (g/mol)	CAS
$\beta$ -TCP		310,18	7758-81-4
MCPM	Sigma-Aldrich	252,07	10031-30-8
Ácido cítrico		192,12	77-92-9
Ácido málico		134,09	6915-15-7
PEG		6000	25322-68-3
Pirofosfato cálcio		254,10	401552

É de salientar que o MCPM foi guardado na estufa a  $60^\circ\text{C}$  devido ao seu carácter higroscópico. O PEG adquirido apresenta-se sob a forma de flocos. Para uniformizar a sua distribuição na solução, foi triturado até ficar reduzido a pó.

### 3.2.1 Fase sólida

A fase sólida é composta pela conjugação dos pós MCPM e  $\beta$ -TCP, em quantidades equimolares. Ambos os pós são misturados num almofariz através da ação do pilão, imediatamente antes da adição da fase líquida, o que proporciona uma redução adicional dos pós provocada pela pressão exercida. É importante garantir uma mistura homogénea.

As variantes da componente sólida correspondem à incorporação na mistura dos pós de pirofosfato de cálcio (0,5%) e de PEG (5% e 10%). A presença destes aditivos teve como objetivo testar a sua influência no tempo de presa e na coesão, respetivamente.

### 3.2.2 Fase líquida

A fase líquida é composta por um agente retardador. Foram testados dois ácidos orgânicos: ácido málico (AM) e ácido cítrico (AC). Para o ácido cítrico estudaram-se duas concentrações diferentes: 0,5M e 1M; em relação ao ácido málico, apenas se utilizou a concentração de 0,5M. Ambos os ácidos foram diluídos em água destilada.

### 3.2.3 Mistura das fases sólida e líquida

A mistura das duas fases foi efetuada com o auxílio de uma espátula durante 30 a 60 segundos, até se observar uma pasta homogênea. Começa-se a contar o tempo desde o início da mistura. O tempo de mistura está incluído na contagem do tempo de presa.

Designando a proporção entre fase sólida-fase líquida por PLR, foram testadas as seguintes condições: PLR = 1.5, 2, 3 e 4 g/mL.

Em suma, o procedimento experimental da produção da brushite consiste em:

- 1 – Colocar os pós (fase sólida) em quantidades equimolares numa caixa de Petri;
- 2 – Adicionar a fase líquida na PLR pretendida;
- 3 – Misturar vigorosamente durante 30 a 60 segundos as fases, até se formar uma pasta homogênea;
- 4 – Deixar secar ao ambiente e determinar o tempo de presa.

Para facilitar a identificação das condições de produção de cada cimento, a designação dos cimentos seguirá a seguinte nomenclatura: PLR[ ]\_Ácido[ ]\_P\_P[ ], onde o Ácido corresponde à abreviatura do ácido cítrico (AC) ou málico (AM) e respetiva concentração molar [ ], P indica a presença de pirofosfato e P[ ] indica a presença de PEG e respetiva concentração. Caso os aditivos não estejam mencionados na nomenclatura, significa que não foram utilizados. Como exemplo, PLR2\_AM0,5\_P\_PEG5, corresponde ao ácido málico 0,5M, com presença de pirofosfato e 5% de PEG, numa PLR de 2 g/mL.

## 3.3 Tempo de presa

O tempo de presa é referido como o fator mais decisivo na utilização prática de um CPC. Existem dois métodos para o determinar: um que faz uso de um instrumento conhecido por aparelho de Vicat e outro que é referido como método das agulhas Gillmore [21, 35, 56].

Neste trabalho, utilizou-se um aparelho de Vicat que foi cedido pelo Departamento de Engenharia Civil da FCT/UNL. A utilização do aparelho foi adaptado da norma (NP) EN 196-3 (1990) que regula os métodos de ensaio de cimentos, tipicamente usados em construção cívil. De acordo com esta norma, o tempo de presa é medido com base na avaliação da resistência de uma pasta de cimento à penetração de uma agulha com 1 mm<sup>2</sup> de secção, sob a ação de um peso de 300g.

A figura 3.1 mostra o aparelho de Vicat utilizado e um esquema que permite identificar melhor as suas componentes. Como se pode observar, o aparelho consiste numa estrutura provida de uma vara móvel (A) de aproximadamente 300 g com uma agulha amovível (B). Neste trabalho foi utilizada uma agulha de 1,2 mm de diâmetro. Anexado à estrutura está um ponteiro (C) que permite perceber qual a profundidade de penetração da agulha no cimento, através da leitura efetuada na escala milimétrica (D); o parafuso (E) permite

ajustar a posição da vara. A pasta foi colocada num molde cilíndrico, com 10 mm de altura e 34,50 mm de diâmetro. Optou-se pela utilização deste molde, mais pequeno do que o indicado na norma atrás referida, para minimizar a quantidade de material empregue em cada ensaio. Considerou-se que a adaptação é razoável tendo em conta a aplicação do CPC a caracterizar (preenchimento de pequenos espaços de aumento de osso para suporte dentário).

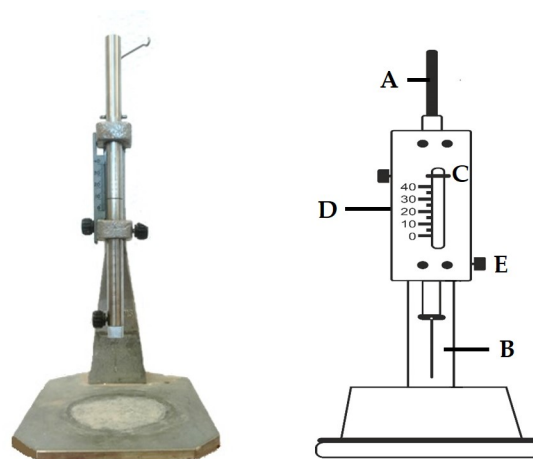


Figura 3.1: Aparelho de Vicat: em foto (à esquerda) e em esquema (à direita). No esquema as letras representam: A – Vara móvel; B – Agulha amovível C – Ponteiro; D – Escala graduada (em milímetros); E – Parafuso que suporta a vara.

O ensaio inicia-se com a mistura dos componentes no molde e a respetiva colocação da vara na posição de espera. Posteriormente, coloca-se o molde sob a agulha. Em intervalos de tempo adequados e sucessivos, posiciona-se a agulha até que esta esteja em contacto com a superfície do material para que a vara comece a penetrar o cimento na posição de repouso, evitando aceleração adicional; nesta altura, liberta-se a vara e regista-se o valor da penetração da agulha recorrendo à indicação do ponteiro na escala milimétrica.

#### Tempo de presa inicial

O tempo inicial de presa corresponde ao tempo decorrido desde o início da mistura e a perda de plasticidade do cimento. Em termos práticos, o início desta fase ocorre quando se observa perda de viscosidade e de brilho da pasta.

Sendo um conceito relativamente simples, utilizou-se o procedimento sugerido no anexo B da norma ABNT ISSO 5833. É um procedimento de avaliação qualitativa do tempo de presa inicial, denominado teste da luva que se inicia após a mistura da pasta. Com uma luva cirúrgica, pressiona-se o cimento; enquanto a interface entre a luva e o cimento registar formação de fibra, o cimento ainda está a endurecer e continua-se a repetir o mesmo procedimento em intervalos de 30 segundos. O tempo de presa inicial regista-se quando, depois de pressionar o cimento, a luva se mantém limpa. É de frisar que o registo do tempo de presa inicial engloba o tempo de mistura dos componentes.

Por forma a confirmar os resultados obtidos pelo método da luva, realizaram-se ensaios com o aparelho de Vicat. Em intervalos de tempo sucessivos, faz-se leituras. Quando a agulha deixa de penetrar  $4 \pm 1$  mm, atinge-se o tempo de presa inicial.

#### Tempo de presa final

Neste caso, os ensaios de presa foram exclusivamente executados no aparelho de Vicat. Considera-se ter-se atingido o fim de presa quando a agulha não penetra mais do que 0,5 mm na pasta. Este é o tempo ao fim do qual a agulha não imprime qualquer sinal no cimento. Quando se verificou o fim de presa, repetiu-se o procedimento 3 vezes em diferentes locais do molde para confirmar que a rigidificação do cimento era uniforme.

Para verificar a reprodutibilidade dos resultados, efetuaram-se 3 ensaios repetindo o procedimento acima descrito. Os resultados dos tempos de presa inicial e final são apresentados na forma média  $\pm$  desvio-padrão desses 3 ensaios.

### **3.4 Teste de coesão**

Para aplicações em regiões vascularizadas, é fulcral que o cimento produzido apresente uma boa coesão. O procedimento utilizado para quantificar a quantidade de partículas libertadas da superfície do cimento foi adaptado do método de perda de massa descrito na literatura [31] e que é semelhante ao descrito na secção 2.3.4.1.

Os cimentos a testar foram produzidos e deixados a secar à temperatura ambiente, durante 24h. Estes apresentam uma área superficial de aproximadamente 12 cm<sup>2</sup>. Para cada condição, produziram-se 2 réplicas. De seguida, colocou-se cada amostra num frasco contendo 10 mL de PBS (o PBS utilizado foi o mesmo referido nos testes de degradação) por forma a ficar totalmente imersa. Os frascos foram mantidos na estufa a 37°C, em constante agitação garantida por um agitador orbital.

A perda de massa foi medida após os seguintes períodos de imersão: 2, 4, 8, 16 e 32 dias. Após cada um destes períodos, procedeu-se à pesagem de massa da amostra procedendo da seguinte forma: aspira-se o meio e o cimento fica a secar na estufa durante 24h, a 37°C. A equação utilizada para a determinação da perda de massa é semelhante à equação 2.5.

Os fatores cuja influência foi averiguada nos testes de coesão compreendem a utilização de ácido cítrico 0,5M e 1 M e de ácido málico 0,5M na fase líquida, a razão PLR da fase sólida, e a utilização de aditivos pirofosfato a 0,5% e de PEG 5%.

### **3.5 Difração de Raios-X**

A Difração de Raios-X (DRX) é uma técnica em que se faz incidir um feixe de raios-X no material em estudo. A difração do feixe por uma estrutura cristalina origina um padrão de intensidades de difração. Assim, é possível caracterizar a partir do padrão de difração a estrutura das fases cristalinas de um material.

Os difratogramas foram obtidos num difratómetro “MiniFlex+” Desktop X-ray, da marca *Rigaku* e sistema *XPERT-PRO* (radiação  $\text{Cu } \alpha$ , 45 kV, 40 mA). O varrimento ( $2\theta$ ) foi feito entre os  $5^\circ$  e os  $70^\circ$ , em passos de  $0,0334225^\circ$ .

### 3.6 Teste de citotoxicidade

Quando se pretende desenvolver um produto para aplicações médicas, devem realizar-se testes de citotoxicidade para avaliar potenciais danos que o produto possa provocar.

Um dos aspetos da brushite (que se pretende impregnar na membrana em desenvolvimento) que pode vir a causar danos nos tecidos circundantes é o seu carácter ácido. Assim, efetuaram-se testes preliminares para avaliar o carácter ácido de lixiviados da brushite, produzidos como descritos na seção 3.2. Monitorizou-se o seu pH usando o medidor de pH HANNA Instruments Hi 4521. Para avaliar possíveis efeitos citotóxicos foram realizados testes de extrato em que se avalia alterações na viabilidade celular de uma cultura estabelecida quando se colocam as células em contacto com o extrato da brushite.

O teste de citotoxicidade iniciou-se com a esterilização das amostras (previamente pesadas) com etanol a 70% e posterior lavagem com PBS estéril numa câmara de fluxo laminar. Colocou-se cada amostra num tubo estéril e adicionou-se DMEM sem soro, numa proporção de 2,5 mL/g de amostra. Passado 24h, retirou-se a amostra do frasco com meio. A amostra foi lavada e colocada noutra frasco com novo meio como aquando da primeira imersão. Este procedimento foi repetido 4 vezes, com 3 réplicas para cada condição no total de 6 condições de produção testadas. As quatro diferentes condições de obtenção de extratos simula a evolução temporal da acidez a que a brushite poderá expor o meio oral na sequência da lavagem natural devido à circulação de fluídos nesse meio. Os efeitos citotóxicos foram avaliados numa cultura de células Vero. Após a sementeira, colocou-se as células a incubar na estufa de  $\text{CO}_2$  (Sanyo MCO19AIC(UV)) a  $37^\circ\text{C}$ . Os procedimentos detalhados encontram-se no Apêndice 1.

Células metabolicamente ativas são capazes de reduzir resazurina em resorufina. Estes dois compostos têm características colorimétricas diferentes. Alterações de cor no meio que decorrem da atividade metabólica das células podem ser determinadas pelas variações de absorvância que ocorrem, sendo esta variação proporcional à viabilidade celular. A resazurina tem um pico máximo de absorvância que ocorre aos 600 nm enquanto a resorufina tem aos 570 nm. Deste modo, utilizou-se a resazurina como indicador da viabilidade celular.

Todos os procedimentos de cultura foram realizados na câmara de segurança microbiológica (Labculture® Class II).

## ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DA BRUSHITE NA MEMBRANA

O capítulo 4 corresponde à fase final do trabalho laboratorial, onde se procedeu ao estudo e otimização do processo de incorporação da brushite na membrana oclusiva.

### 4.1 Estudo da incorporação

Numa primeira fase, pretendeu-se demonstrar que é possível incorporar a brushite na membrana oclusiva; numa fase posterior, projetaram-se diversas formas de incorporar a brushite na membrana oclusiva e definir o melhor método – é de salientar que a preparação da componente cerâmica e consequente incorporação na membrana será feita pelo médico imediatamente antes da colocação do produto no defeito ósseo. Tendo em conta a aplicabilidade do produto em desenvolvimento, impõe-se que o processo seja relativamente simples para poder ser implementado em clínicas dentárias. Outro fator determinante para um produto ser aceite para fins comerciais é o prazo de validade apresentado pelo material, sem que sofra alterações no desempenho.

Para a incorporação da membrana procedeu-se da seguinte forma:

- 1 – Preparou-se a mistura de pós desejada e adicionou-se à fase líquida;
- 2 – Procedeu-se à mistura das duas fases numa caixa de petri;
- 3 – Quando se verificou o início da presa, mergulhou-se a membrana na pasta;
- 4 – Com o auxílio duma espátula, pressionou-se a brushite contra a membrana para se infiltrar mais facilmente nos poros;
- 5 – Observou-se a morfologia da membrana no microscópio ótico;
- 6 – A membrana foi pesada antes e depois da incorporação da brushite. A diferença de massas (inicial e final) corresponde à quantidade de brushite impregnada.

## 4.2 Tratamento com NaOH

O caráter hidrofóbico apresentado pelo PCL dificulta a impregnação da brushite na membrana. Assim, foi efetuado um tratamento químico com NaOH com o objetivo de aumentar a hidrofiliabilidade das membranas. Esta abordagem introduz grupos hidroxilo e carboxilato, o que melhora a molhabilidade do material graças aos ligeiros efeitos eletronegativos das funcionalidades dos grupos adicionais [37].

As membranas foram imersas numa solução de NaOH (EKA Chemicals,  $M_n = 40,01 \text{ g/mol}$ ) preparada com uma concentração de 1M, num frasco com a tampa mal enroscada e assim colocadas no exsiccador. Nessa altura, retirou-se o frasco do exsiccador e deixou-se a membrana permanecer no seu interior durante 2h. Ao fim deste tempo lavou-se cuidadosamente a membrana com água destilada.

## 4.3 Distribuição granométrica e moagem dos pós

Antes de se proceder à redução de tamanho das partículas do MCPM e  $\beta$ -TCP, fez-se uma análise da distribuição granométrica dos pós através da técnica de difração laser. O resultado obtido representa a média dos 5 ensaios realizados para cada tipo de pó e corresponde ao diâmetro das partículas. Os ensaios foram realizados pela Andreia Lopes, bolsista de investigação do Departamento de Ciências dos Materiais, recorrendo ao equipamento Mastersizer Hydro 2000MU Instruments.

Foi efetuada uma moagem do MCPM num moinho planetário (Planetary Mono Mill "Pulverisette 6"), novamente em colaboração com a Andreia Lopes. Neste moinho a redução dos pós ocorre devido à sua projeção contra a parede da cuba de ágata que decorrem de movimentos de rotação impostos pelo mecanismo de funcionamento do moinho. Os pós em questão foram colocados na cuba de ágata, contendo 5 bolas grandes (20 mm diâmetro) e 10 bolas pequenas (10 mm diâmetro), durante 15 minutos a 240 rpm. O procedimento foi repetido 4 vezes porque durante o processo de rotação, o pó tende a agregar-se nas paredes da cuba.

## 4.4 SEM

A técnica de SEM foi utilizada para observar se a brushite ficou incorporada na membrana. A descrição da técnica encontra-se descrita na secção 2.3.1.1.

## APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o estudo. Em primeiro lugar, apresenta-se a influência dos parâmetros de fiação nas fibras obtidas por eletrofiação e as caracterizações morfológica, mecânica e térmica das membranas produzidas. São depois apresentadas, de entre as formulações dos cimentos produzidos, aquelas que foram considerados as melhores, tendo em conta os resultados dos testes de caracterização efetuados. Numa fase final, abordam-se as estratégias adotadas para impregnar a brushite na membrana.

### 5.1 Variação dos parâmetros de produção das membranas

A técnica de eletrofiação foi usada na produção das membranas oclusivas. Antes de produzir as membranas, foram analisadas que condições de produção seriam as mais adequadas para atingir o objetivo pretendido. Assim, procedeu-se a um estudo prévio do efeito de vários parâmetros de eletrofiação na morfologia das fibras. Os parâmetros analisados foram: concentração da solução polimérica, distância agulha-coletor, caudal e tensão. É de referir que durante os testes as condições ambientais (temperatura ambiente e humidade relativa entre 50 a 60 %) e o sistema de eletrofiação utilizado foram os mesmos.

Apesar dos efeitos da variação de determinado parâmetro nem sempre conduzirem à mesma tendência devido à interdependência do conjunto de parâmetros no resultado final da fiação, em geral, verificam-se os efeitos sumariados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Efeito dos parâmetros de produção na morfologia das fibras.

Parâmetros de produção	Alterações na morfologia das fibras
<b>Concentração</b>	Quanto maior a concentração, maior o diâmetro das fibras; A solução só se torna fiável a partir de uma certa concentração;
<b>Caudal</b>	Quanto maior o caudal, maior o diâmetro das fibras; Um caudal demasiado pequeno pode levar a interrupções no jato; Um caudal muito elevado leva a acumulação de solução na ponta da agulha;
<b>Tensão</b>	Quanto maior a tensão, menor o diâmetro das fibras;
<b>Distância agulha-coletor</b>	Quanto maior a distância, menor o diâmetro das fibras; Distâncias curtas podem não permitir a evaporação do solvente durante o tempo de voo, o que leva à obtenção de fibras fundidas;

#### Soluções de PCL em clorofórmio

Neste estudo foram utilizadas soluções de PCL dissolvidas em clorofórmio. Estabeleceu-se como parâmetros de referência as condições seguintes: concentração de 10% de PCL, caudal 0,5 ml/h, tensão 15 kV e distância agulha-coletor 20 cm. Analisou-se depois o efeito da variação de um parâmetro mantendo os restantes fixos nos valores de referência.

#### **Varição da concentração**

Registou-se um aumento do diâmetro das fibras, para valores de concentração maiores. A gama de concentrações que se fiou encontra-se entre 8% e 15%. Soluções com concentrações inferiores a 5% de PCL não possuem viscosidade suficiente para se formarem fibras; a partir de 8% a solução é fiável, mas surgem alguns defeitos (fusos ou contas). A concentração de 15% produz fibras bastante uniformes com os parâmetros-padrão, pelo que será possível produzir fibras com concentrações ainda mais elevadas. A figura 5.1 representa as fibras eletrofiadas com diferentes concentrações.

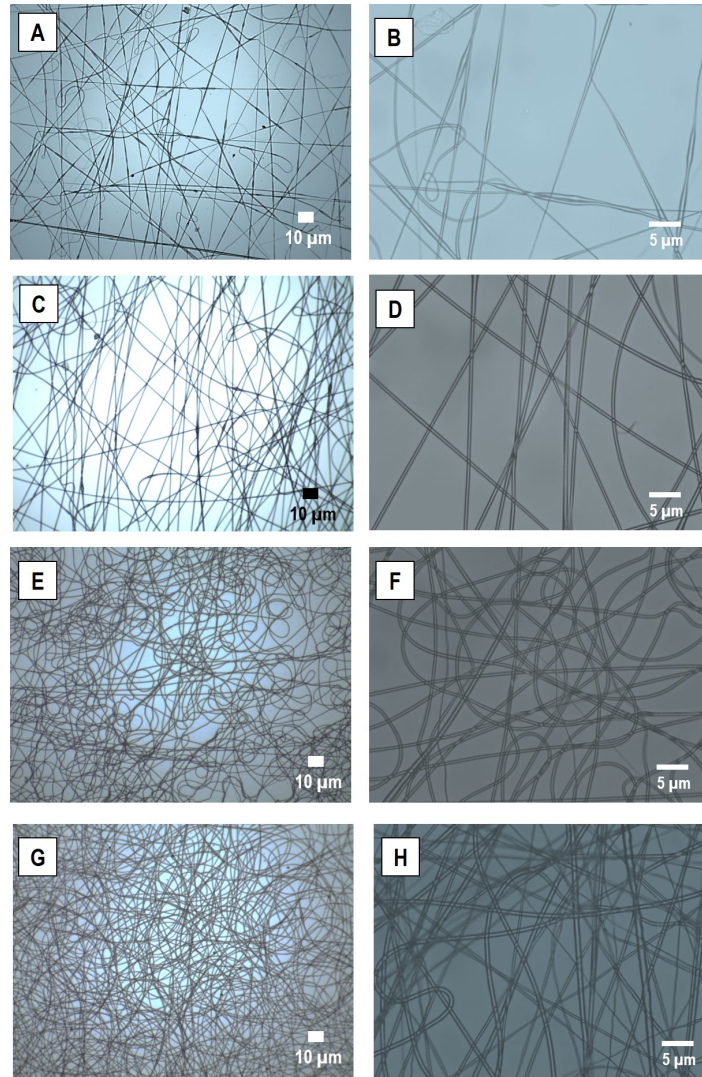


Figura 5.1: Imagens de microscopia ótica de deposições com diferentes concentrações de PCL em clorofórmio com os parâmetros padrão. A e B - [8%] m/m; C e D - [10%] m/m; E e F - [12%] m/m; G e H - [15%] m/m. A, C, E e G - ampliação 100x; B, D, F e H - ampliação 400x.

### Varição da tensão

O aumento da tensão pode resultar em dois efeitos distintos: aumento do diâmetro das fibras porque aumenta a aceleração do jato para o coletor; ou, diminuição do diâmetro das fibras porque ocorre um maior estiramento das fibras. Neste caso em particular, observou-se um ligeiro aumento do diâmetro das fibras bem como o aparecimento de imperfeições e fibras com diâmetros significativamente diferentes (finas e grossas) para a tensão de 20 kV (Figura 5.2).

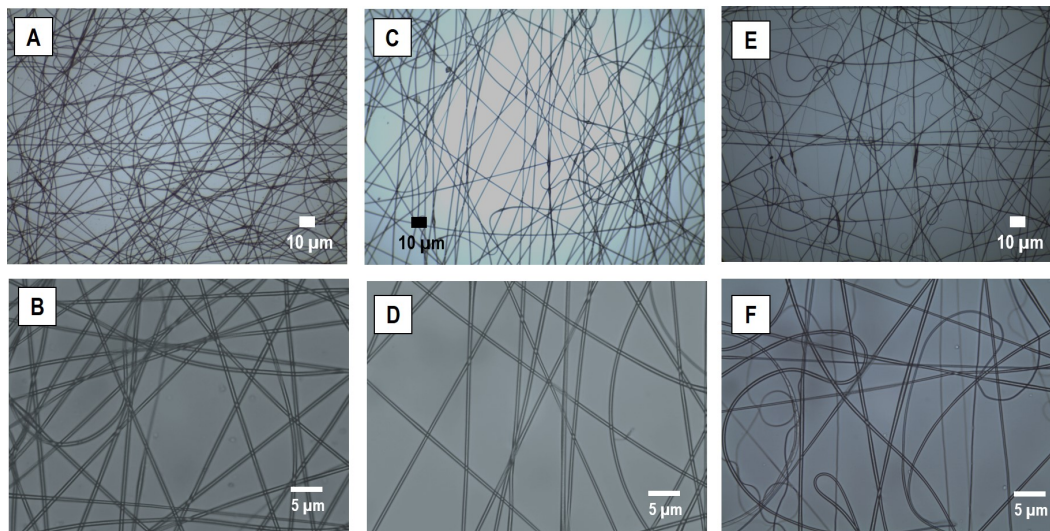


Figura 5.2: Imagens de microscopia ótica de deposições de PCL em clorofórmio sujeitas a variações de tensão. A e B – 10kV; C e D – 15 kV; E e F – 20 kV. A, C e E – ampliação 100x; B, D e F – ampliação 400x.

#### Variação do caudal

Variou-se o caudal entre 0,2 ml/h e 0,8 ml/h. Para o caudal mais baixo, obtiveram-se fibras não-uniformes. Do aumento de caudal de 0,5 ml/h para 0,8 ml/h ocorre um ligeiro aumento do diâmetro das fibras e maior uniformidade morfológica, como ilustrado na figura 5.3.

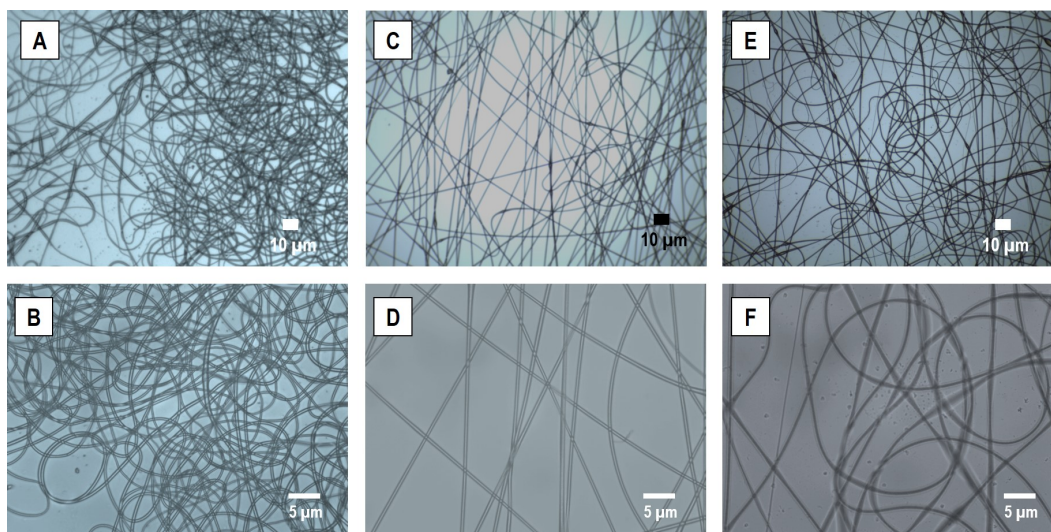


Figura 5.3: Imagens de microscopia ótica de deposições de PCL em clorofórmio sujeitas a variações de caudal. A e B – 0,2 ml/h; C e D – 0,5 ml/h; E e F – 0,8 ml/h. A, C e E – ampliação 100x; B, D e F – ampliação 400x.

### Varição da distância da agulha ao coletor

Neste caso, variou-se a distância da agulha ao coletor de 10 a 30 cm. Para as fibras eletrofiadas com a menor distância, observou-se fusão de fibras. Este fato deriva da inexistência de distância suficiente para o solvente evaporar, como se observa na Figura 5.4.

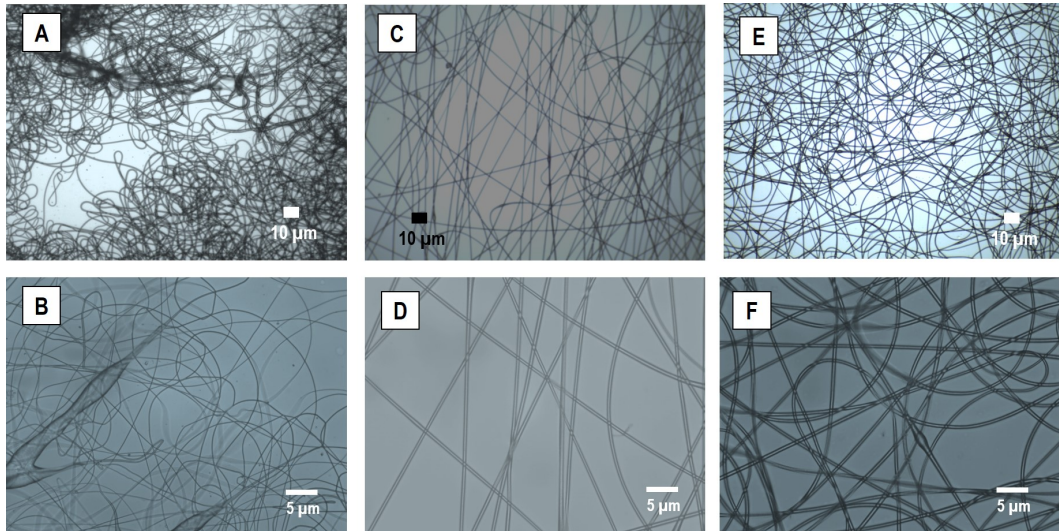


Figura 5.4: Imagens de microscopia ótica de deposições de PCL em clorofórmio sujeitas a variações de distância agulha-coletor. A e B – 10 cm; C e D – 20 cm; E e F – 30 cm. A, C e E – ampliação 100x; B, D e F – ampliação 400x.

Eletrofiaram-se também soluções poliméricas de PCL dissolvidas em ácido acético com o intuito de diminuir o diâmetro das fibras e assim conseguir membranas que garantam maior oclusividade.

#### Solução de PCL em soluções de ácido acético

Neste caso, testaram-se soluções de 23% de PCL dissolvido em ácido acético glacial a que se adicionou pequenas percentagens de água. Por forma a avaliar a influência das diferentes concentrações de água na morfologia das fibras, foi estabelecido as seguintes condições padrão de produção: caudal 0,3ml/h, tensão 12 kV e distância agulha-coletor 20 cm [57].

Para facilitar a dissolução do PCL nas soluções aquosas de ácido acético concentrado pode recorrer-se à utilização de ultra-sons (colocando o frasco da solução num banho de ultra-sons). Como este tratamento pode contribuir para a diminuição da viscosidade da solução, testou-se qual o efeito do tratamento com ultra-sons na morfologia das fibras. Os efeitos observados na morfologia das fibras correspondem a um tratamento com a duração de 30 minutos (Figuras 5.5 e 5.6)

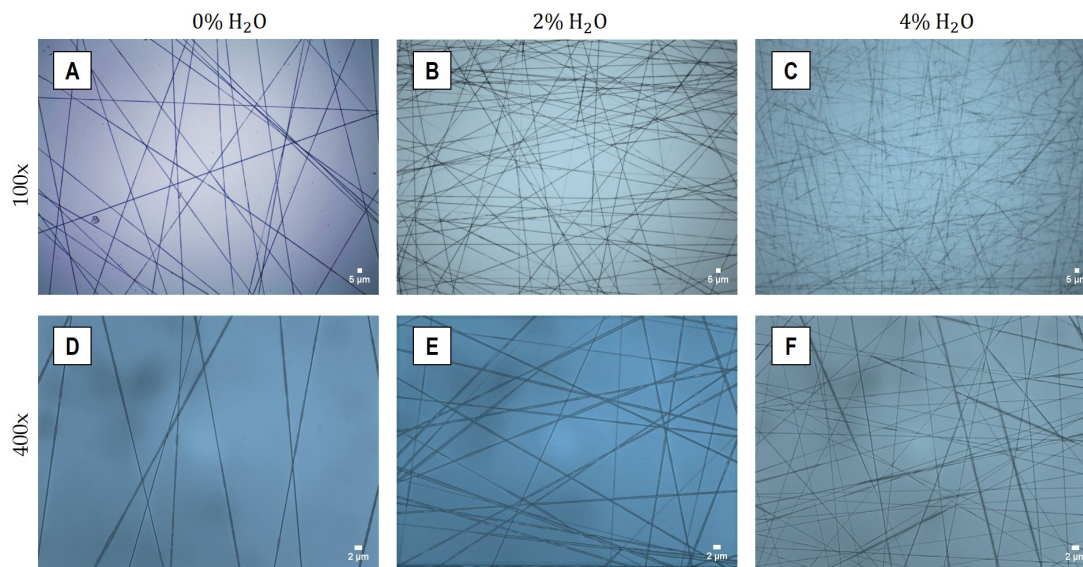


Figura 5.5: Imagens de microscopia ótica de fibras eletrofiadas de soluções, a 23% de PCL em ácido acético com diferentes concentrações de água, que não sofreram tratamento com ultra-sons . A e D – 0% H<sub>2</sub>O; B e E – 2% H<sub>2</sub>O; C e F – 4% H<sub>2</sub>O. A, B e C – ampliação 100x; D, E e F – ampliação 400x.

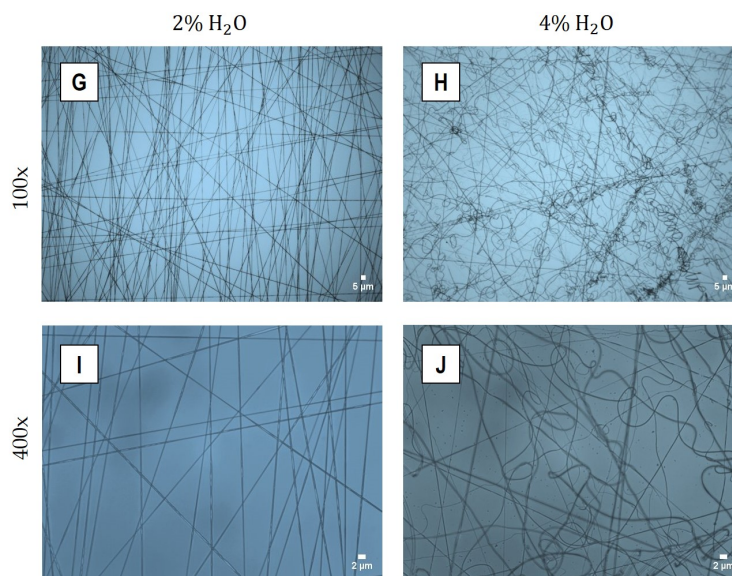


Figura 5.6: Imagens de microscopia ótica de fibras eletrofiadas de soluções, a 23% de PCL em ácido acético com diferentes concentrações de água, que sofreram tratamento com ultra-sons. G e I – 2% H<sub>2</sub>O; H e J – 4% H<sub>2</sub>O. G e H – ampliação 100x; I e J – ampliação 400x.

Relativamente ao tratamento com ultrassons, verificaram-se dois efeitos distintos:

- Na presença de 2% H<sub>2</sub>O na solução, não houve alteração significativa na morfologia das fibras e a fição foi mais uniforme devido à homogeneidade da solução;
- Na solução com 4% H<sub>2</sub>O as soluções tratadas originaram fibras com morfologia irregular, mas sem o tratamento de ultrassons a mistura não era homogênea. Desta forma, a solução de 4% H<sub>2</sub>O passou a ser submetida apenas a 15 minutos de ultrassons para garantir uma mistura mais homogênea, sem comprometer a regularidade das fibras.

A adição de água na solução resultou em fibras com diâmetros menores. Na literatura, está reportado que a viscosidade diminui acentuadamente e a condutividade aumenta em função da quantidade de água presente na solução [57], o que explica o fato do diâmetro das fibras diminuírem com a adição de água devido ao maior estiramento a que estas são sujeitas.

## 5.2 Caracterização das membranas

As membranas, com fibras de diferentes diâmetros, produzidas a partir das soluções de PCL a 23% em ácido acético glacial com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O (0%, 2% e 4%) foram caracterizadas tendo em vista a produção da membrana oclusiva. Todos os valores estão apresentados na forma média  $\pm$  desvio-padrão. Caso contrário, será indicado o seu significado.

### 5.2.1 Morfologia das membranas

Procedeu-se à caracterização morfológica das membranas através da observação das imagens obtidas por SEM. As Figuras 5.7, 5.8 e 5.9 correspondem, respetivamente, às membranas eletrofiadas a partir de soluções com 0%, 2% e 4% de H<sub>2</sub>O. Nas figuras apresentam-se as imagens obtidas por SEM e o respetivo histograma relativo à dispersão do diâmetro das fibras. Estes foram medidos com o programa de processamento de imagem *ImageJ*, tendo sido efetuadas 50 medições para cada condição apresentada. A tabela 5.2 sumariza os valores dos diâmetros médios das fibras e o respetivo desvio padrão.

As fibras da membrana produzida a partir da solução de 23% PCL, com 0% de H<sub>2</sub>O (PCL23\_0) apresentam uma morfologia com alguma irregularidade no diâmetro das fibras (5.7).

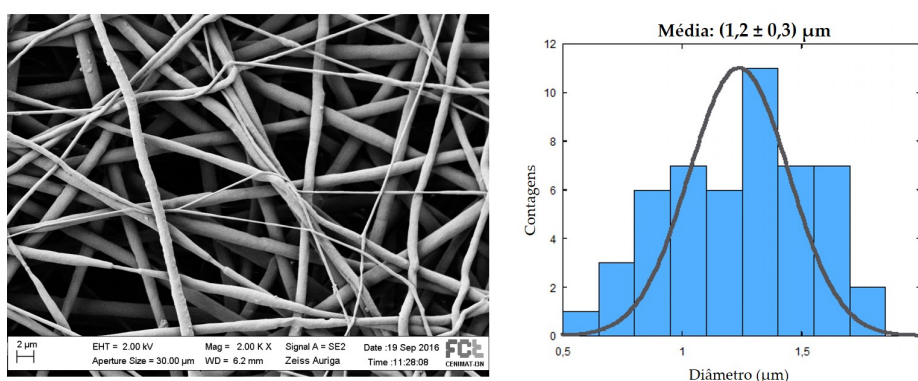


Figura 5.7: Imagem de SEM da membrana PCL23\_0 e respetivo histograma relativo à dispersão dos diâmetros das fibras.

Relativamente à membrana eletrofiada a partir da solução com 2% de água (PCL23\_2), como se pode observar na Figura 5.8, apresenta uma maior dispersão do diâmetro das fibras e mais defeitos ao longo das fibras. Estas características refletem-se no elevado valor do desvio-padrão (mais de 33% do valor da média).

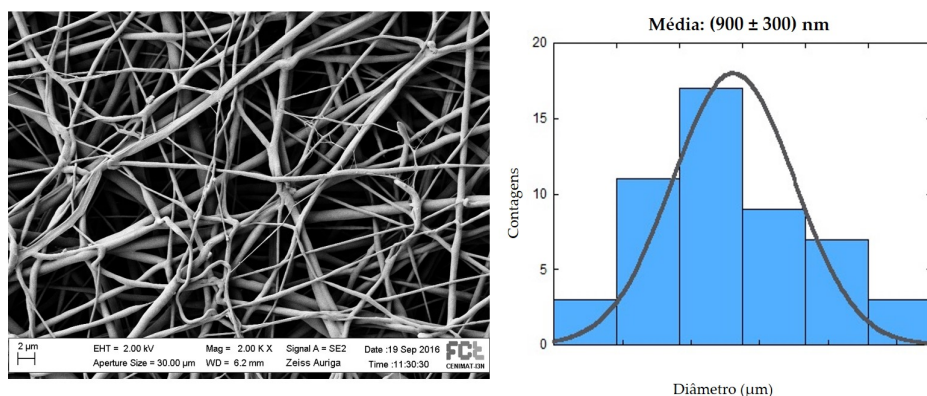


Figura 5.8: Imagem de SEM da membrana PCL23\_2 e respetivo histograma relativo à dispersão dos diâmetros das fibras.

De um modo geral, a membrana eletrofiada a partir da solução com 4% de água (PCL23\_4) apresenta uma distribuição relativamente uniforme do diâmetro das fibras. Verificou-se pontualmente a existência de contas e a fusão entre algumas fibras, como se pode observar na Figura 5.9.

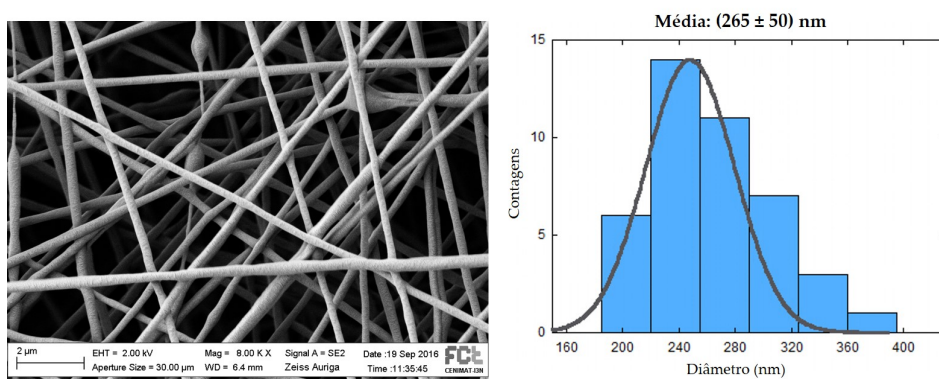


Figura 5.9: Imagem de SEM da membrana PCL23\_4 e respetivo histograma relativo à dispersão dos diâmetros das fibras.

De seguida apresenta-se na Tabela 5.2 um resumo do diâmetro médio das fibras.

Tabela 5.2: Diâmetro médio das fibras obtidas a partir das soluções de 23% de PCL, para 0%, 2% e 4% de H<sub>2</sub>O no solvente à base de ácido acético.

Diâmetro médio		
PCL23_0	PCL23_2	PCL23_4
(1,2 ± 0,3) µm	(0,9 ± 0,3) µm	(265±50) nm

Pode-se concluir que à medida que a concentração de água na solução aumenta, o diâmetro médio das fibras diminui, como já se tinha verificado quando se observaram as membranas no microscópio ótico.

A membrana PCL23\_4 apresenta um padrão de morfologia em forma de “favos” (Figura 5.10). Na periferia do padrão encontra-se fibras de maiores diâmetros e irregulares e deteta-se uma maior incidência de defeitos. As membranas PCL23\_0 e PCL23\_2 não exibem nenhum padrão característico.

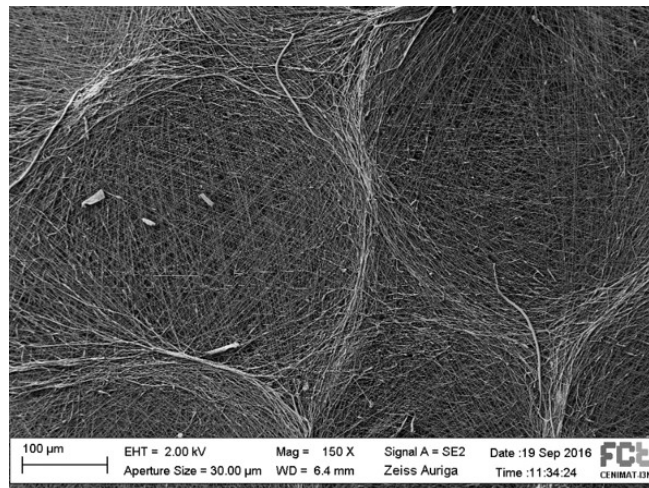


Figura 5.10: Imagem de SEM da membrana PCL23\_4, onde se observa um padrão semelhante a “favos”.

### 5.2.2 Porosidade

Através da equação 2.1, procedeu-se ao cálculo da porosidade determinando em primeiro lugar a densidade aparente em amostras com 3 cm<sup>2</sup>. A densidade do PCL (material denso) utilizada foi a fornecida pelo fabricante, indicada na Tabela 2.1. Em seguida, apresenta-se o resultado do tratamento estatístico efetuado para a porosidade das membranas (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Porosidade das membranas PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4.

Porosidade aparente (%)		
PCL23_0	PCL23_2	PCL23_4
84,6 ± 0,4	85,6 ± 0,3	87,1 ± 0,6

Pode-se constatar que todas as membranas apresentam uma elevada porosidade, como descrito na literatura [45]. Verifica-se um ligeiro aumento da porosidade com a presença de água, sendo no entanto pouco significativo.

### 5.2.3 Calorimetria Diferencial de Varrimento

A título ilustrativo, apresenta-se, na Figura 5.11, um gráfico de DSC representativo. Aí pode-se ver (à esquerda) o pico correspondente à fusão, com a indicação do valor dessa temperatura a que esta ocorre e da área subentendida pelo pico (J/g), que corresponde à entalpia de fusão da amostra. O pico mais à direita corresponde à entalpia de cristalização. A seta que se encontra no canto superior direito do gráfico indica que os picos invertidos correspondem a uma reação exotérmica. Neste caso, pode-se afirmar que o pico de entalpia de fusão é resultante de um processo endotérmico e o pico de entalpia de cristalização de um processo exotérmico. Pode-se consultar os restantes gráficos no Apêndice B.

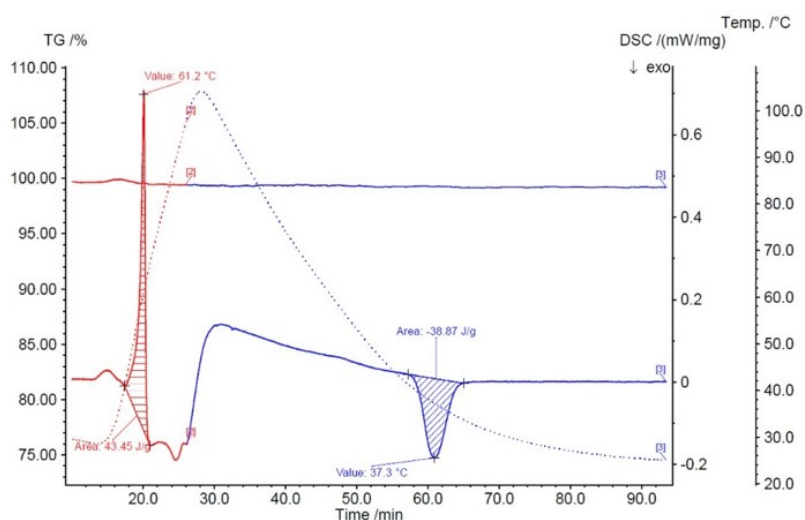


Figura 5.11: Representação gráfica da análise de DSC para a amostra PCL23\_0, com a indicação do valor da temperatura de fusão (61,2°C) e da área do respetivo pico (43,45 J/g) e do valor da temperatura de cristalização (37,3°C) e da área do respetivo pico (-38,87 J/g).

Através da equação 2.2, calculou-se o grau de cristalinidade para as 3 amostras estudadas. Os dados fornecidos pelo DSC bem como o resultado do cálculo da cristalinidade encontram-se na Tabela 5.4. Os valores obtidos para a temperatura de fusão estão em coerência com a temperatura de fusão apresentada para o PCL na secção 2.1.

Tabela 5.4: Valores da temperatura de fusão, entalpia de fusão, entalpia de cristalização e grau de cristalinidade fornecidos pela análise de DSC, das membranas PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4

	Temperatura de fusão (°C)	$\Delta H_f(T_f)$	$\Delta H_c(T_c)$	Grau de cristalinidade (%)
PCL23_0	61,2	43,45	-38,87	59,01
PCL23_2	61,8	48,96	-43,70	66,42
PCL23_4	62,1	51,91	-47,26	71,09

Verificou-se um aumento do grau de cristalinidade com a presença de água na solução. Existem duas explicações plausíveis: como o PCL é um polímero hidrofóbico, com a presença de água pode ocorrer segregação de fases [40], o que leva ao rearranjo das cadeias e, conseqüentemente, formação de mais estruturas cristalinas; por outro lado, a presença de água aumenta a condutividade das soluções e diminui a sua viscosidade e, devido a uma maior repulsão eletrostática e a taxa de evaporação dos solventes, as fibras sofrem um maior estiramento – o que se reflete no diâmetro médio das fibras. Este processo permite que ocorra um rearranjo diferente das cadeias para cada solução.

A presença de água na solução promove a hidrólise do polímero, o que poderia igualmente potenciar a cristalização [58]. No entanto, como as soluções são fiadas após 24h de terem sido preparadas este efeito não deve ser significativo.

O grau de cristalinidade obtido está de acordo com o esperado para fibras eletrofiadas. A rápida taxa de evaporação do solvente associada ao processo de fiação resulta numa fraca nucleação de cristais e, conseqüentemente, uma estrutura cristalina mais pobre [40].

#### 5.2.4 Ensaio de tração

Em seguida, apresenta-se uma curva de tração típica de cada uma das condições estudadas (Figura 5.12).

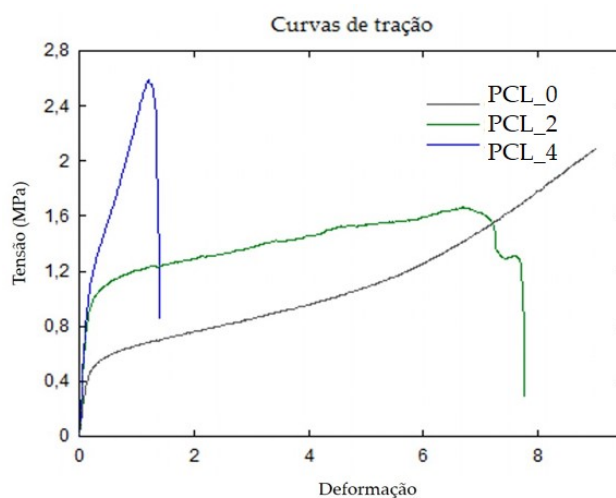


Figura 5.12: Curvas de tração típicas das membranas PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4.

Pode-se verificar que as membranas obtidas a partir da solução sem água não sofrem rutura, até ao limite de extensão permitido pelo equipamento utilizado (9 cm). As membranas PCL23\_2 e PCL23\_4 atingem a rutura dentro deste limite, sendo que a deformação à rutura é significativamente menor no caso da membrana obtida a partir da solução com mais água. Observa-se também que a tensão de rutura é superior para esta membrana. Relativamente à tensão de cedência e ao módulo de elasticidade verifica-se que aumentam com o aumento da quantidade de água na solução fiada, sendo que o aumento é pouco significativo quando a percentagem de água aumenta de 2% para 4%. O aumento do

módulo de Young significa que as membranas se tornam cada vez menos dúcteis e mais facilmente se deformam com a aplicação de uma força uniaxial (Tabela 5.5). Este fenómeno já tinha sido reportado em estudos anteriores [57], apesar de, no presente estudo se terem obtido valores mais altos para o módulo de elasticidade do que os reportados na referência citada.

Tabela 5.5: Módulo Young, Tensão de cedência, Tensão de rutura e Deformação à rutura das membranas PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4.

	PCL23_0	PCL23_2	PCL23_4
<b>Módulo Young (MPa)</b>	7 ± 1	11 ± 1	14 ± 2
<b>Tensão cedência (MPa)</b>	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2
<b>Tensão rutura (MPa)</b>	*	2,0 ± 0,3	2,9 ± 0,5
<b>Deformação à rutura (%)</b>	> 800	800 ± 90	170 ± 40

\*As matrizes não partiram durante o processo de tração

### 5.2.5 Testes de degradação

#### Degradação enzimática

Gan *et al* [59] demonstraram que a *Pseudomonas Lipase* (enzima usada neste trabalho) degrada as ligações éster presentes no PCL. Os resultados obtidos neste trabalho relativamente à perda de massa correspondente à degradação por esta enzima das membranas em estudo estão apresentados na Figura 5.13.

A perda de massa por degradação enzimática das membranas PCL23\_0 e PCL23\_2, é mais acentuada do 8º para o 16º dia do que nos primeiros 8 dias, ao passo que para a membrana PCL23\_4 esse aumento não é tao significativo. Para a membrana PCL23\_4 existe um aumento do 4º para o 8º dia que não se regista tão acentuadamente nas outras membranas.

A matriz PCL23\_2 apresentou tendencialmente uma maior perda de massa. Com o aumento da cristalinidade, espera-se que haja uma degradação mais lenta pois quanto mais organizada for a estrutura cristalina maior a dificuldade para a penetração de agentes degradadores. Na literatura, é descrito que inicialmente ocorre a degradação das fases amorfas, o que normalmente resulta num aumento da cristalinidade do polímero; e que posteriormente a fase cristalina começa a ser degradada [60, 61]. Tendo em conta os graus de cristalinidade calculados anteriormente, seria de esperar a maior perda de massa para a membrana PCL23\_0, o que não se verificou.

Segundo a literatura, a degradação de poliésteres alifáticos *in vivo* resulta principalmente da hidrólise das ligações éster já que a maior parte das enzimas existentes no corpo

não degradam o PCL. Para poliésteres com elevado peso molecular ( $M_n > 5000$ ) é mais provável que, numa primeira fase, ocorra a cisão hidrolítica das cadeias e, quando o peso molecular baixa ( $M_n < 3000$ ), ocorra fagocitose [40, 60, 62].

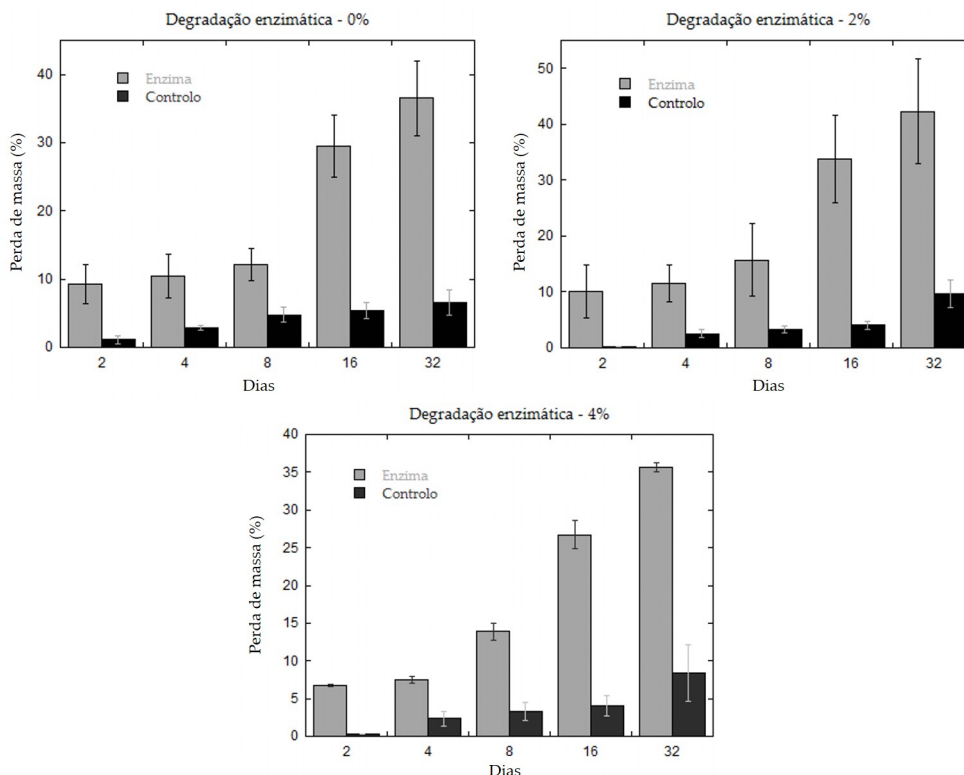


Figura 5.13: Representação gráfica da perda de massa (%) por degradação enzimática das membranas PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4, em função dos dias de exposição à enzima e ao controlo (PBS).

De seguida, apresentam-se as imagens de SEM referentes às membranas de PCL23\_0 sujeitas aos testes de degradação em meio enzimático e a do controlo (Figura 5.14). Estas imagens são representativas do efeito que se observou nas 3 membranas.

As imagens permitem verificar que a fase amorfa foi degradada, observando-se o “esqueleto” cristalino das fibras. Observa-se uma degradação volúmica, onde o processo de degradação iniciou-se do interior para o exterior, sem alterar a forma inicial das fibras. A taxa de degradação ao fim dos 32 dias corresponde a aproximadamente 40% para todas as membranas, o que é coerente com os resultados mostrados pelas imagens de SEM, onde se observa uma degradação acentuada das fibras. Aquando da realização do teste, observou-se que as membranas em estudo tornaram-se mais translúcidas ao longo dos dias de exposição. No entanto, nunca se desintegram nem perderam a forma inicial.

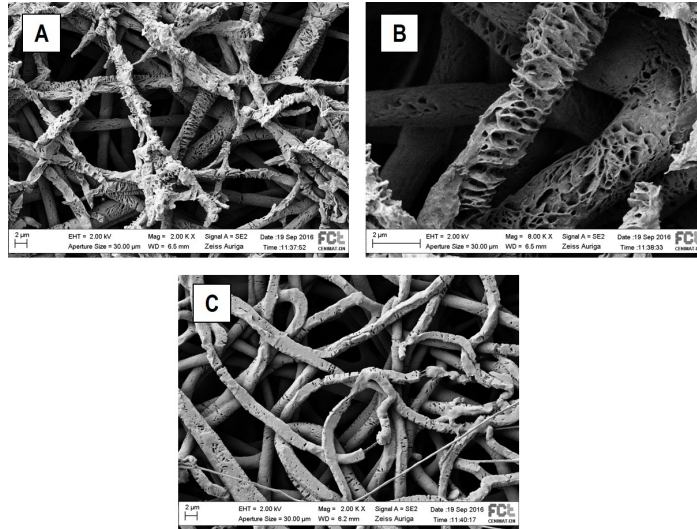


Figura 5.14: Imagens de SEM da membrana PCL23\_0 submetida a teste de degradação durante 32 dias: A e B – em meio enzimático (diferentes ampliações); C – em PBS.

### Degradação por espécies reativas

As espécies reativas de oxigénio (ROS) usadas pretendem mimetizar a degradação que ocorre no organismo resultante do normal metabolismo do oxigénio e que envolve a redução do oxigénio molecular. Assim, é importante ter em conta este tipo de degradação visto que a membrana será implantada numa região altamente vascularizada.

Os resultados de perda de massa das membranas em estudo, relativos à degradação por espécies reativas de oxigénio estão apresentados na Figura 5.15.

A degradação mais significativa ocorreu para o dióxido de potássio. Entre as mudanças de meio decorridas entre o 16<sup>o</sup> e o 32<sup>o</sup> dia, as membranas submetidas a este agente oxidativo desfizeram-se completamente. Este teste deveria ser repetido e reajustando a concentração do agente oxidante para valores mais representativos da presença no organismo.

O efeito do peróxido de hidrogénio na degradação não foi relevante, tendo registado a maior perda mássica para a membrana PCL23\_4 ( $\approx 10\%$ ), ao fim de 32 dias.

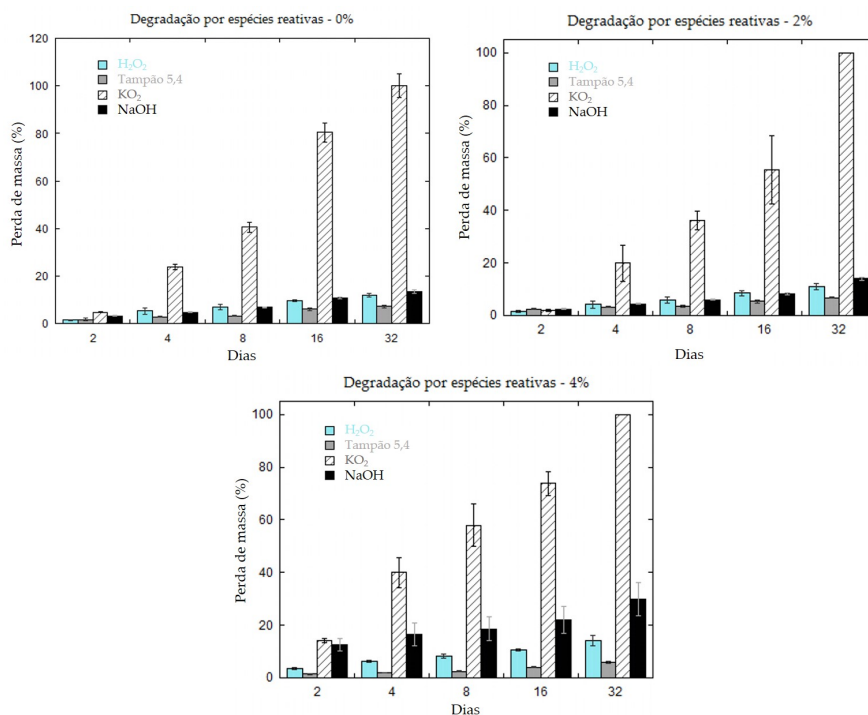


Figura 5.15: Representação gráfica da perda de massa (%) ocorrida por degradação por espécies reativas das membranas PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4, em função dos dias de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Tampão 5,4, KO<sub>2</sub> e NaOH.

De seguida, apresenta-se as imagens de SEM referentes à membrana PCL23\_0 sujeita aos testes de degradação por espécies reativas (Figura 5.16). As imagens correspondentes às matrizes de PCL23\_2 e PCL23\_4 são idênticas a esta e por isso não são apresentadas.

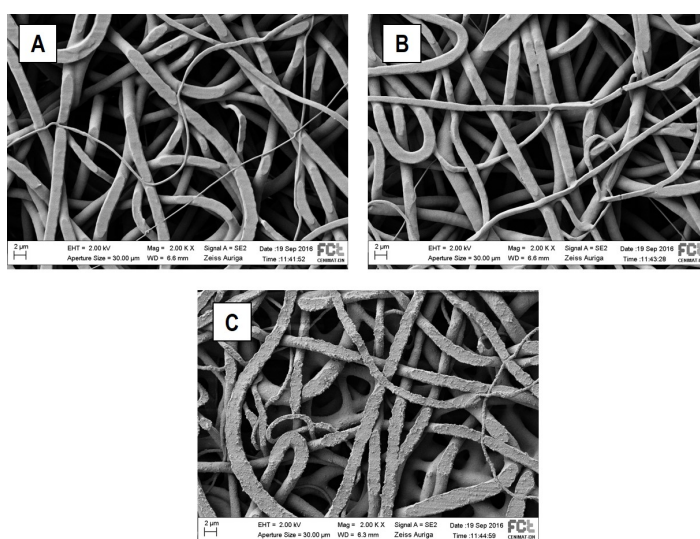


Figura 5.16: Imagens de SEM da membrana PCL23\_0 submetida a teste de degradação durante 32 dias: A – numa solução de peróxido de oxigénio; B – numa solução tampão 5,4; C – numa solução de hidróxido de sódio.

Não se observa diferenças significativas destas membranas (Figura 5.16) para as membranas originais (Figura 5.7). Este resultado é coerente com as percentagens de perda de massa apresentadas anteriormente que são relativamente baixas.

Um dos critérios para a utilização de uma membrana oclusiva biodegradável é esta possuir uma taxa de degradação adequada. Para que a regeneração óssea seja bem-sucedida e a membrana cumpra o seu devido papel, a sua integridade deve manter-se entre 4-6 semanas. Assume-se que em geral as membranas estudadas são adequadas, visto que a sua estabilidade ao fim dos 32 dias expostas ao meio enzimático e a duas ROS foi assegurada. É necessário repetir os valores para o dióxido de potássio para nos certificarmos que aquele resultado é devido ao valor elevado que se utilizou.

### 5.3 Caracterização da brushite

Caracterizou-se a brushite relativamente ao tempo de presa, coesão, alterações estruturais, através do DRX e citotoxicidade em função da PLR e da presença de aditivos – pirofosfato de cálcio e PEG. Estudou-se preliminarmente o melhor procedimento para produzir o cimento.

#### 5.3.1 Produção da brushite

Na literatura, aparecem relatos da mistura das fases líquida e sólida como tendo sido efetuada de duas formas distintas: vigorosamente durante 30 segundos (método I) ou durante 30s a 60s até garantir que a mistura esteja homogénea (método II). Verificou-se que a segunda abordagem permite obter cimentos mais homogéneos e que não se desintegram tão facilmente, pelo que foi a adotada.

#### 5.3.2 Tempo de presa

Como descrito no capítulo 3, a brushite é obtida a partir da mistura equimolar de  $\beta$ -TCP e MCPM com a fase líquida. Neste estudo, avaliou-se o tempo de presa para as 3 fases líquidas estudadas: AM0,5; AC0,5 e AC1. Verificou-se o tempo de presa inicial obtido pelo método da luva e com o aparelho de Vicat. Os valores obtidos foram concordantes, pelo que se passou a usar o método da luva devido à sua simplicidade.

Na totalidade, testou-se o tempo de presa inicial e final de 60 formulações diferentes de brushite. Selecionaram-se as melhores formulações tendo em conta os requisitos enunciados na introdução:

- Tempo de presa inicial compreendido entre 3 a 8 minutos, mas com preferência para tempos mais perto de 3 minutos;
- Tempo final de presa inferior a 15 minutos;
- O intervalo entre o tempo de coesão e o tempo de presa inicial superior a 1 minuto.

Na tabela 5.6 apresentam-se os resultados em minutos para o tempo de presa inicial e final dos cimentos, em função da PLR e da composição. Destas composições, identifica-se a verde as que cumprem os requisitos, a azul as que cumprem os requisitos mas onde o tempo de presa inicial se afasta dos 3 minutos e a vermelho as formulações que não cumprem um ou mais dos requisitos enunciados.

Tabela 5.6: Tempo de presa inicial (*I*) e final (*F*) em minutos em função da PLR para todas as formulações estudadas.

	PLR	AM 0,5M		AC 0,5M		AC 1M	
		<i>I</i> (min)	<i>F</i> (min)	<i>I</i> (min)	<i>F</i> (min)	<i>I</i> (min)	<i>F</i> (min)
Sem aditivos	1,5	8,0 ± 0,4	12,4 ± 0,5	9,4 ± 0,6	14 ± 1	21 ± 1	27 ± 2
	2	4,1 ± 0,5	10,3 ± 0,6	5,8 ± 0,4	8,2 ± 0,5	11,0 ± 0,7	15 ± 1
	3	2,5 ± 0,3	4,0 ± 0,4	3,4 ± 0,3	5,4 ± 0,5	4,6 ± 0,5	6,9 ± 0,7
	4	1,3 ± 0,2	3,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	4,1 ± 0,4	3,3 ± 0,3	5,1 ± 0,6
5% PEG	1,5	9,2 ± 0,6	12 ± 1	10,1 ± 0,9	16 ± 1	14 ± 1	19 ± 1
	2	5,6 ± 0,7	6,9 ± 0,6	6,5 ± 0,5	8,9 ± 0,8	11 ± 1	16 ± 1
	3	3,6 ± 0,4	5,2 ± 0,5	3,3 ± 0,2	5,8 ± 0,6	10,1 ± 0,9	14,7 ± 0,8
	4	*	*	*	*	5,7 ± 0,5	7,9 ± 0,6
10% PEG	1,5	10,4 ± 0,7	16 ± 1	11,2 ± 0,9	17 ± 1	19 ± 2	23 ± 2
	2	6,8 ± 0,6	7,9 ± 0,4	8,2 ± 0,7	10,5 ± 0,8	13 ± 1	15 ± 1
	3	2,1 ± 0,8	4,0 ± 0,5	1,5 ± 0,3	2,9 ± 0,3	8,9 ± 0,6	14,2 ± 0,9
	4	*	*	*	*	8,1 ± 0,4	10,4 ± 0,9
Pirofosfato	1,5	9,1 ± 0,6	14 ± 1	11 ± 1	15 ± 1	23 ± 1	28 ± 2
	2	5,6 ± 0,5	11,5 ± 0,6	7,8 ± 0,7	8,2 ± 0,5	13 ± 1	17 ± 1
	3	4,0 ± 0,5	6,3 ± 0,4	4,2 ± 0,5	7,0 ± 0,6	6,4 ± 0,5	9,4 ± 0,7
	4	1,9 ± 0,2	4,7 ± 0,4	3,2 ± 0,4	5,3 ± 0,4	4,6 ± 0,3	7,1 ± 0,5
Pirofosfato e 5%PEG	1,5	9,9 ± 0,6	14 ± 1	13 ± 1	16 ± 1	19 ± 1	24 ± 2
	2	6,1 ± 0,7	12,3 ± 0,6	8,4 ± 0,6	9,9 ± 0,6	14 ± 1	18 ± 1
	3	4,5 ± 0,4	6,1 ± 0,5	4,8 ± 0,3	6,9 ± 0,5	8,2 ± 0,7	14 ± 1
	4	2,7 ± 0,3	5,2 ± 0,4	3,0 ± 0,5	4,7 ± 0,3	5,2 ± 0,6	8,5 ± 0,9

\*Pasta demasiado viscosa para se medir os tempos de presa

Da análise gráfica, verifica-se que para a PLR1,5 nenhuma das composições investigadas cumpriu os requisitos relativos ao tempo de presa.

Para todas as formulações estudadas, verificou-se que quanto maior a PLR, menor o tempo de presa inicial e final, o que está de acordo com a literatura [23]. Também se comprovou de forma consistente para todos os casos que a presença de pirofosfato de cálcio aumenta o tempo que o cimento necessita para endurecer.

A presença de PEG a 5% aumentou ligeiramente o tempo de presa inicial no caso do ácido cítrico, independentemente da PLR usada; nas outras duas fases líquidas, o aumento não é consistente. Para o PEG a 10%, a sua presença aumentou o tempo de presa para todas as formulações apresentadas, apesar deste aditivo ser conhecido por ser promotor da coesão. O retardamento da presa foi mais evidente para o PEG 10% relativamente ao PEG 5%, para PLR de 1,5, 2 e 4, à exceção do observado para o AC 1M. Para PLR3, observou-se o efeito contrário: de forma geral, o PEG 5% apresentou valores para o tempo de presa superiores ao PEG 10%.

Para os ácidos málico e cítrico a 0,5M não foi possível medir o tempo de presa para as formulações com PEG (5 e 10%), na PLR4 porque a reação foi demasiado rápida. De forma geral, para o ácido málico e cítrico a 0,5M, o caso em que o tempo de presa registado foi maior corresponde à formulação com a presença de ambos os aditivos, sendo esse tempo crescente com a diminuição da PLR. Para o ácido cítrico 1M, os valores não são consistentes: em alguns casos o tempo de presa aumenta relativamente ao original e noutros casos, diminui, pelo que nada se pode concluir neste caso.

Relativamente à fase líquida, o ácido cítrico (3 grupos carboxilos) tem um poder de retardação mais elevado que o ácido málico (2 grupos carboxilos). Este fenómeno já tinha sido reportado em estudos anteriores [63, 64]. Ao que tudo indica, esta diferença está relacionada com o número de grupos carboxílicos presentes nos diferentes ácidos. O ácido cítrico com a maior concentração revelou ter um tempo de presa maior para todos os casos.

À medida que a reação de endurecimento se processa, a temperatura aumenta [22]. Durante as medidas do tempo de presa, monitorizou-se a temperatura. O valor máximo registado foi 28°C.

### 5.3.3 Teste de coesão

Tendo em conta os valores obtidos para o tempo de presa, decidiu-se prosseguir o estudo apenas com algumas composições, documentadas na Tabela 5.7. Escolheu-se as formulações que apresentaram um tempo de presa inicial e final adequado (verde e azul) para os diferentes ácidos estudados. Como em nenhuma situação, 10% PEG apresentou um dos casos considerados mais adequados (assinalados a verde na Tabela 5.6), passou-se apenas a estudar o 5% PEG. Este é descrito na literatura como um agente coesivo e queria-se perceber se a PLR afeta o seu poder de coesão, pelo que se testou duas PLRs diferentes.

Como se pretende avaliar a influência das diferentes fases líquidas usadas, estas foram testadas para todos os casos selecionados (apesar de, em muitos casos, para o ácido cítrico 1M os tempos de presa não cumprirem os requisitos).

Tabela 5.7: Diferentes formulações da fase sólida e dos aditivos dos cimentos submetidos ao teste de coesão. Cada uma destas formulações foi testada para três formulações da fase líquida: ácido cítrico 0,5 M e 1M e ácido málico 0,5 M.

Fase sólida	Aditivos	
	Pirotosfato 0,5%	PEG 5%
2	X	X
3	X	X
2	X	✓
3	X	✓
3	✓	X
3	✓	✓

O teste de coesão permitiu avaliar a quantidade de partículas libertadas a partir da superfície do cimento. A razão massa da amostra/quantidade de PBS utilizada foi a mesma para todas as situações para evitar diferenças na perda de massa associadas à saturação do meio pela presença dos íons de cálcio [31]. Da mesma forma, a área superficial das amostras foi a mesma para todos os cimentos produzidos para que os valores de coesão não estivessem associados a este fator.

A desintegração superficial foi visivelmente superior para os cimentos produzidos com ácido cítrico na fase líquida. Nos frascos destes observavam-se partículas soltas ao contrário dos que continham os cimentos produzidos utilizando ácido málico, como se pode constatar na Figura 5.17. Esta erosão superficial comprometeu a forma da amostra. Através da ferramenta de medição do *Image J* verificou-se que houve uma diminuição de cerca de 20% no diâmetro para os cimentos preparados com ácido cítrico.

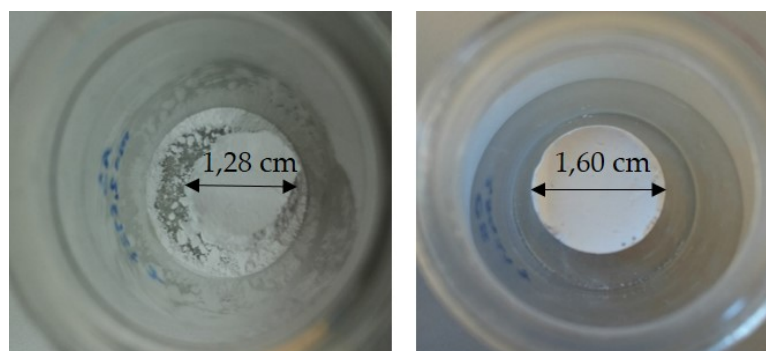


Figura 5.17: Imagens dos blocos de cimentos sujeitos ao teste de coesão e imersos durante 32 dias em PBS. Cimentos produzidos utilizando ácido cítrico 0,5M (à esquerda) e ácido málico (à direita).

No gráfico da Figura 5.18 representa-se a perda de massa das diferentes composições em estudo em função dos dias de imersão em PBS.

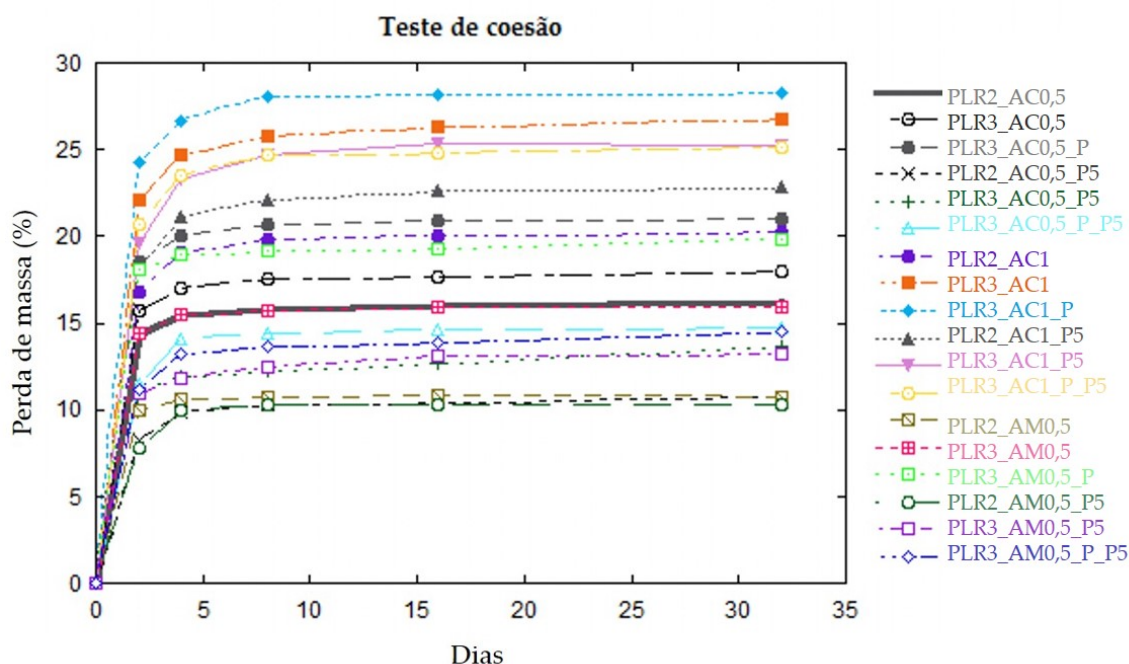


Figura 5.18: Perda de massa dos cimentos de brushite sujeitos ao teste de coesão, durante 32 dias.

É de salientar que a perda de massa mais significativa ocorre nos primeiros dois dias de teste e, ao fim do 8º dia, a massa da amostra tende a estabilizar. Antes de se efetuar o teste, as amostras foram deixadas a secar durante 2 dias na estufa a 37°C para evitar perdas de massa coincidentes com o decorrer da reação de endurecimento. Apesar de, na maioria das situações, o tempo final de presa da brushite corresponder a intervalos de tempo curtos (minutos), na literatura é descrito que a reação de endurecimento só estará realmente completa ao fim de 2 dias [22]. Assim, a elevada perda de massa registada ao 2º dia, não pode ser explicada por este fenómeno. No entanto, pode estar associada ao MCPM que não reagiu na sua totalidade durante a reação de endurecimento devido à saturação da solução. Quando o cimento foi imerso em PBS libertou-se MCPM e como este apresenta uma solubilidade elevada (vide Tabela 1.2), pode explicar a perda de massa significativa (entre 8 e 22%). Por outro lado, o carácter ácido apresentado pelo MCPM pode aumentar a dissolução do  $\beta$ -TCP e conduzir a um aumento da perda de massa. Todavia, como este tem um baixo valor de solubilidade (vide Tabela 1.2), é pouco provável que tenha um impacto tão acentuado como o observado. Estas hipóteses serão analisadas na secção 5.3.4, tendo em conta os difratogramas obtidos por DRX.

Para facilitar a análise dos resultados, apresenta-se na Tabela 5.8 os valores da perda de massa registada ao fim dos 32 dias.

Tabela 5.8: Registo da perda de massa (%) ao fim de 32 dias para todas as composições e razões estudadas no teste de coesão.

	Perda de massa (%)					
	Sem aditivos		5% PEG		Pirofosfato	Pirofosfato e 5% PEG
	PLR2	PLR3	PLR2	PLR3	PLR3	PLR3
<b>AM 0,5M</b>	11,1 ± 0,5	16 ± 1	10,0 ± 0,5	13 ± 1	14 ± 1	20 ± 1
<b>AC 0,5M</b>	16 ± 2	18 ± 1	11 ± 1	14 ± 1	15 ± 2	21 ± 2
<b>AC 1M</b>	20 ± 1	27 ± 3	23 ± 2	25 ± 2	25 ± 3	28 ± 3

Considerando situações idênticas no que respeita aos outros parâmetros de produção, a fase líquida que originou cimentos com a menor perda de massa foi o ácido málico a 0,5M. Segue-se, o ácido cítrico a 0,5M com valores tendencialmente superiores de perda de massa e, por último, o ácido cítrico a 1M para o qual se registaram as perdas de massa mais significativas.

Verifica-se um ligeiro aumento de coesão para os casos do ácido málico e cítrico a 0,5M produzidos com PEG. Para AC 1M, este registo não foi significativo. O maior registo de perda de massa ocorre na condição em que estão presentes ambos os aditivos. Nesta mesma condição, observou-se uma desintegração de partículas maior.

Para as formulações onde se testaram duas PLR, verificou-se que para a PLR2 ocorre uma perda de massa menor do que a PLR3. Na secção anterior, observou-se que uma maior quantidade de fase líquida implica um tempo de presa maior. Como o tempo de presa é maior, a reação ácido-base que ocorre é mais lenta, o que permite uma maior organização na estrutura cristalina. Uma estrutura mais cristalina dificulta a entrada do meio, dificultando a desintegração.

#### 5.3.4 Difração de Raios-X

Foram estudados os efeitos na estrutura cristalográfica da utilização de diferentes fases líquidas (ácido cítrico ou málico), da razão PLR, da adição de pirofosfato e de PEG. Assim, testou-se as seguintes 6 formulações: PLR2\_AC0,5, PLR3\_AC0,5, PLR3\_AC0,5\_P, PLR3\_AC0,5\_P5, PLR2\_AC1 e PLR2\_AM0,5. O impacto da imersão em PBS também foi avaliado, analisando amostras após a sua produção e amostras após terem sido submetidos ao teste de coesão durante 32 dias.

Os difratogramas obtidos através do DRX permitiram observar quais os fosfatos de cálcio que se formam em diferentes condições quando o cimento endurece, através das diferentes estruturas cristalinas observadas.

A figura 5.19 ilustra os difratogramas obtidos dos cimentos antes de serem submetidos ao teste de coesão, analisados através do programa *Data Viewer*, da PANalytical.

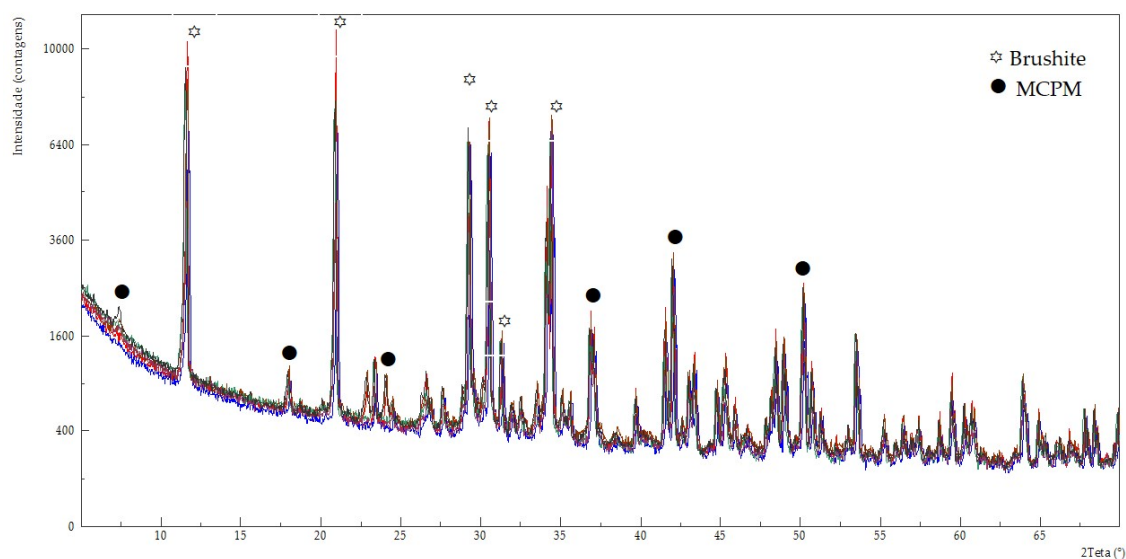


Figura 5.19: Difratograma dos cimentos submetidos à análise por DRX após produção e identificação dos picos característicos da brushite e MCPM.

Em todos os difratogramas, obteve-se o mesmo padrão de picos apesar de se verificar diferentes intensidades dependendo do cimento em questão. Através das fichas padrões do JCPDS identificou-se a presença de brushite (JCPDS 98-000-4706) e MCPM (JCPDS 00-009-0347). Os picos característicos da brushite ( $2\theta = 11,68^\circ, 21,8^\circ, 29,28^\circ, 30,68^\circ$  e  $34,18^\circ$ ) evidenciam a sua forte presença no cimento, o que significa que a reação que origina os cimentos em estudo favorece a formação de cristais de brushite, como seria de esperar. A análise por DRX confirmou igualmente a existência de MCPM no cimento, indicada pelos picos  $2\theta = 7,47^\circ, 18,25^\circ, 24,22^\circ, 37,23^\circ$  e  $45,72^\circ$  e  $50,96^\circ$ .

Os cimentos foram analisados 2 dias após a sua produção pelo que se pode ter uma noção da constituição do cimento quando iniciou o teste de coesão e verificar se as hipóteses formuladas anteriormente se confirmam. A perda de massa elevada verificada ao 2º dia do teste de coesão pode ser justificada pelo MCPM não reagido aquando da formação do cimento de brushite. A sua presença nos difratogramas significa que existe uma quantidade de MCPM na formulação que não reage com o  $\beta$ -TCP para originar cristais de brushite. Possivelmente, quando se coloca o cimento em PBS durante o teste de coesão, permite ao MCPM reagir e libertar-se, originando a perda significativa observada ao 2º dia.

Para perceber quais as alterações que ocorrem na estrutura cristalina quando em contacto com o PBS (que pretende mimetizar o meio fisiológico a que o cimento estará sujeito), apresenta-se a análise de DRX dos cimentos testados depois de terminado o teste de coesão, ou seja, depois de terem estado imersos em PBS durante 32 dias (Figura 5.20).

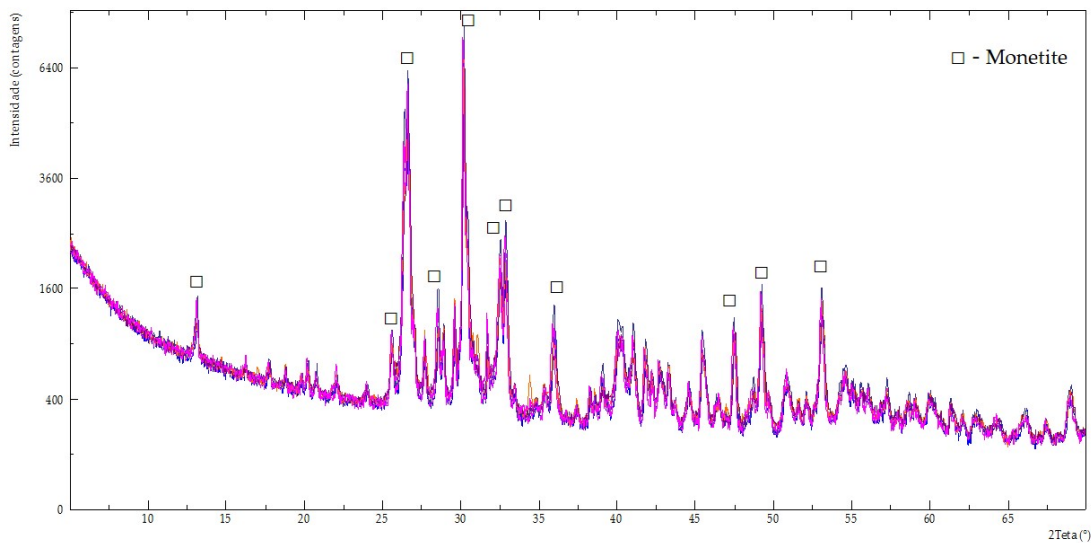


Figura 5.20: Difratograma dos cimentos submetidos à análise por DRX após imersão em PBS durante 32 dias e identificação dos picos característicos da monetite.

Comparativamente aos difratogramas anteriores, os picos observados são diferentes na medida em que não se observam os picos característicos nem da brushite nem do MCPM. Neste caso, os picos obtidos são característicos da fase anidra da brushite, designada de monetite (identificados através da ficha JCPDS 98-000-4706). Este resultado indica que, durante o processo de avaliação de perda de massa em que os cimentos de brushite tiveram imersos em PBS durante 32 dias, ocorreu conversão de brushite em monetite.

Na literatura, é referido que os cimentos de brushite podem ser usados como precursores para a formação da monetite. A precipitação da fase anidra ocorre pelo processo de desidratação da brushite ou modificando as condições de precipitação da brushite, a fim de promover a cristalização da monetite [22]. Neste caso, a situação mais plausível para a conversão de brushite para monetite é uma decomposição térmica. Estudos referem que cimentos de brushite armazenados a temperaturas superiores a 60°C tendem a degradar-se, originando a monetite [65]. Os cimentos de brushite submetidos ao teste de coesão foram guardados na estufa a 37°C durante o teste de coesão e entre pesagens, o que pode ter influenciado a sua conversão – apesar de ser uma temperatura inferior à referida na literatura. Este acontecimento merece ser investigado futuramente, com mais detalhe.

### 5.3.5 Teste de citotoxicidade

Para este estudo, testou-se as mesmas formulações que na Difração de Raios-X.

Para cada formulação da brushite foram testados lixiviados correspondentes a 4 períodos de 24h de lixiviação, como descrito no capítulo de materiais e métodos. Sucintamente: uma amostra permanece 24h em meio de cultura para produzir o lixiviado do primeiro período (T1), a amostra é depois lavada e colocada em novo meio de cultura por mais

um período de 24h para produzir o lixiviado do segundo período (T2) e assim sucessivamente. As condições dos lixiviados testados correspondem aos diferentes períodos de 24h indicados na Tabela 5.9:

Tabela 5.9: Períodos de lixiviação empregues no teste de citotoxicidade.

Período/Condição	Intervalo de tempo de lixiviação da amostra para obtenção do extrato / h
T1	0 - 24
T2	24 - 48
T3	48 - 72
T4	72 - 96

Quando as células do meio estão metabolicamente ativas, convertem a resazurina em resorufina, permitindo avaliar a viabilidade celular. Esta conversão emite um azul fluorescente, diferente do azul da resazurina. Na Figura 5.21 é apresentada a imagem da placa de cultura onde foram efetuados os testes de citotoxicidade. Delimitam-se a preto as zonas da placa onde foram colocados os extratos das formulações testadas (as mesmas que foram alvo da análise de DRX) com a respetiva indicação: o controlo negativo (C-, células em DMEM), controlo positivo (C+, células sujeitas a um agente tóxico - DMSO) e controlo de meio (CM, DMEM). Para cada formulação, cada uma das 4 colunas corresponde, da esquerda para a direita, aos períodos de lixiviação T1, T2, T3 e T4. Em cada uma destas colunas encontram-se os resultados das 3 réplicas usadas.

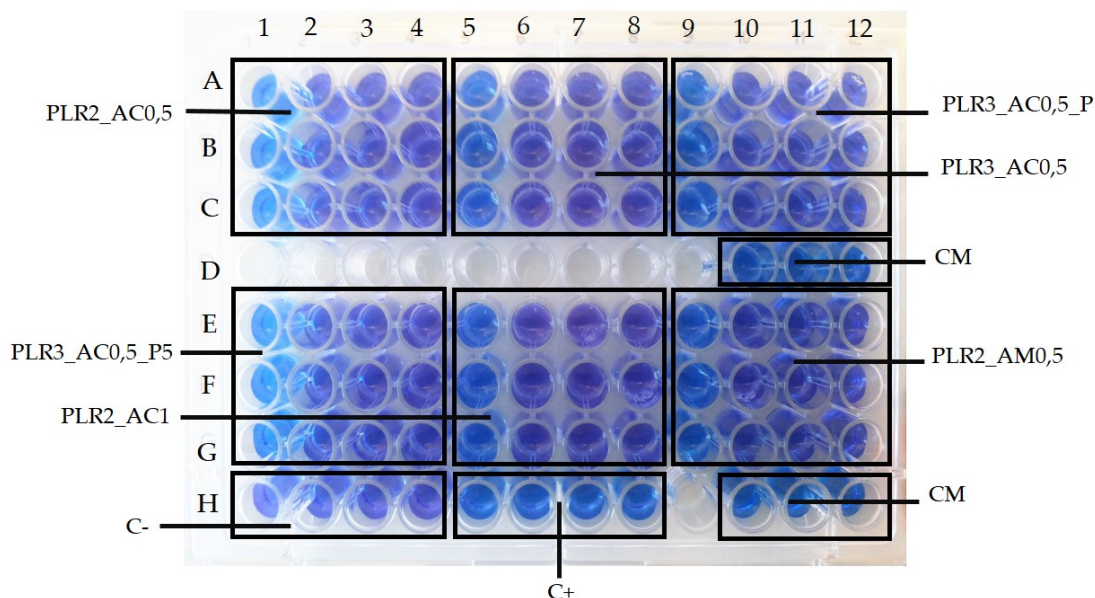


Figura 5.21: Imagem da placa de 96 poços utilizada no teste de citotoxicidade, com a indicação das condições testadas (ver texto anterior).

Pela observação da placa de 96 poços da figura acima, podemos aferir que para todas as formulações, os extratos obtidos no período T1 evidenciam uma baixa viabilidade celular. A observação das células ao microscópio é consistente com os resultados do teste de viabilidade celular baseado nas alterações de absorvância da solução de rezasurina usada no teste, como se ilustra na Figura 5.22.

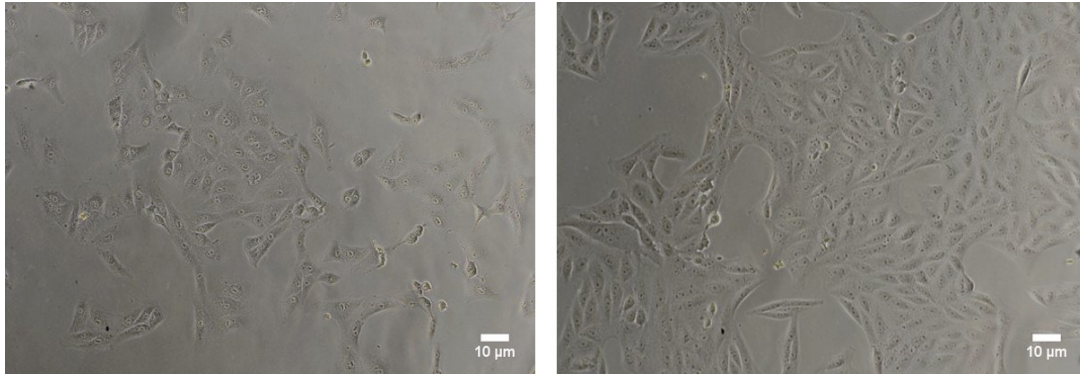


Figura 5.22: Imagens de microscópio ótico das células sujeitas a extratos da formulação PLR2\_AC0,5 obtidos no período T1 (à esquerda) e no período T2 (à direita).

Pela observação da Figura acima referida, a imagem correspondente ao período T1 apresenta menos células que a correspondente ao período T2 e a sua morfologia difere significativamente da do controle negativo que é semelhante à exibida para T2. Também nos poços correspondentes aos períodos T3 e T4 se verifica que as células se apresentam como no controle negativo.

Os resultados quantitativos da viabilidade celular avaliada indiretamente pelo teste colorimétrico e relativa à situação do controlo negativo de células (para o qual se considera uma viabilidade celular de 100%) estão indicados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10: Resultados da viabilidade celular relativa à situação do controlo negativo.

Designação	Viabilidade celular (%)			
	Períodos de obtenção do extrato			
	T1	T2	T3	T4
PLR2_AC0,5	7 ± 1	95 ± 1	94 ± 3	98 ± 1
PLR3_AC0,5	5 ± 2	92 ± 3	101 ± 2	94 ± 2
PLR3_AC0,5_P	5 ± 2	90 ± 1	97 ± 2	95 ± 2
PLR3_AC0,5_P5	9 ± 2	91 ± 3	94 ± 5	93 ± 3
PLR3_AC1	5 ± 2	86 ± 3	99 ± 1	90 ± 3
PLR3_AM0,5	2 ± 1	98 ± 3	98 ± 4	97 ± 2

De acordo com os resultados do teste de viabilidade, os extratos obtidos nas primeiras 24 horas de lixiviação apresentam uma toxicidade severa (classificação frequentemente usada quando se verificam valores de viabilidade relativa abaixo de 50%). No entanto, esta desaparece (considerando não tóxica uma condição onde se verifique uma viabilidade relativa maior do que 90%) para os extratos correspondentes aos períodos subsequentes à exceção do verificado para o período T2 da formulação PLR3\_AC1 onde a viabilidade celular revela uma ligeira toxicidade (valor de viabilidade entre 80 e 90%). Este resultado pode ser consequência da concentração mais elevada de ácido (1M) nesta situação, relativamente aos outros cimentos (AC 0,5M e AM 0,5M). Em relação às restantes formulações, não se observou diferenças significativas.

Para membranas oclusivas, um dos critérios fundamentais é a biocompatibilidade pelo que o resultado destes testes apontam para a necessidade de realizar mais testes para perceber se a citotoxicidade apresentada no período inicial pelo material fixante pode comprometer de forma preocupante os tecidos circundantes ao local de implantação da membrana e a regeneração óssea. No capítulo introdutório, descreve-se que a reação que origina a brushite inicia-se com a dissolução da componente ácida, o que resulta numa diminuição significativa do pH. Também a utilização de ácido na fase líquida para controlo do tempo de presa contribui para que o material retenha um carácter ácido.

Do teste preliminar realizado para avaliar o pH dos extratos de brushite (como referência utilizou-se a formulação com o maior carácter ácido, PLR1,5\_AC1), registou-se para T1 um valor de pH 3 (o pH do PBS diminui de 7,4 para 3 em contacto com o cimento de brushite). Para intervalos de tempo subsequentes, o valor aumentou até atingir um pH neutro para a condição T4. Desta forma, a libertação de ácido observada inicialmente é provavelmente a causa de morte celular nas primeiras 24 horas de lixiviação.

É de salientar que a quantidade e a área superficial do cimento exposta ao meio nos ensaios de citotoxicidade realizados é muito superior aos previstos para a fixação da membrana, o que conduzirá a valores acrescidos de citotoxicidade relativamente ao valor efetivo.

### **5.4 Impregnação da brushite**

Nesta fase do trabalho, decidiu-se apenas impregnar nas membranas poliméricas PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4 a brushite com a formulação PLR2\_AM0,5\_PEG5. A escolha do ácido e dos aditivos baseou-se nos resultados promissores obtidos nos testes anteriores e porque a presença de PEG favorece a coesão do cimento. A PLR2 foi eleita face às restantes devido à maior facilidade de impregnar na membrana uma pasta mais líquida.

A observação ao microscópio ótico das primeiras tentativas de impregnação da brushite nas membranas poliméricas revelou que a impregnação não ocorreu, observando-se apenas grânulos de brushite aderida à superfície das membranas. Quando se manipulou a

membrana, a maioria da brushite desagregou-se e a membrana perdeu a rigidez adquirida devido à presença da mesma. A pesagem das membranas não mostrou diferenças significativas na massa das membranas devidas à presença da brushite, como se observa na tabela 5.11. Estas observações são consistentes com o facto da brushite se encontrar apenas numa camada à superfície da membrana que se perde facilmente.

Tabela 5.11: Pesagem das membranas sem qualquer tipo de tratamento antes e depois da tentativa de impregnação da brushite.

	Massa inicial (mg)	Massa final (mg)	% (Infiltração)
PCL_0H	6,1 ± 0,1	6,4 ± 0,1	4,7 ± 0,6
PCL_2H	5,9 ± 0,1	6,1 ± 0,1	3,3 ± 0,4
PCL_4H	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,1	*

\*Valor negativo face ao valor obtido para as massas inicial e final

Face ao insucesso registado na incorporação da brushite na membrana oclusiva, equacionou-se duas estratégias para solucionar o problema: aumentar a hidrofiliidade do PCL através de um tratamento com uma solução de NaOH e a diminuição da granulometria dos pós.

#### 5.4.1 Tratamento com NaOH

Na literatura está documentado que o valor de ângulo de contacto do PCL se encontra entre os valores 120-130° (valores típicos de um material hidrofóbico) e que após o tratamento com uma solução de NaOH, o material se torna hidrofílico [40, 45]. Após se ter realizado o tratamento com NaOH verificou-se de fato que uma gota de água na superfície da membrana foi rapidamente absorvida pela matriz de fibras. Apesar da membrana se ter tornado hidrofílica, a impregnação registou um insucesso semelhante ao anterior, como mostram os resultados da Tabela 5.12.

Tabela 5.12: Pesagem das membranas sujeitas a tratamento com NaOH antes e depois da tentativa de impregnação da brushite.

	Massa inicial (mg)	Massa final (mg)	% (Infiltração)
PCL_0H	6,2 ± 0,1	6,7 ± 0,1	6,1 ± 0,2
PCL_2H	5,7 ± 0,1	6,0 ± 0,1	5,0 ± 0,4
PCL_4H	5,7 ± 0,1	5,5 ± 0,1	*

\*Valor negativo face ao valor obtido para as massas inicial e final

#### 5.4.2 Moagem dos pós

Do estudo preliminar da distribuição granulométrica, obteve-se o valor ( $5,47 \pm 0,05$ )  $\mu\text{m}$  para o diâmetro médio do  $\beta$ -TCP, dado pela análise de 5 amostras. Dado o valor

reduzido dos pós, não se procedeu à moagem – o moinho de bolas disponível não permite obter pós mais finos que o original. Relativamente ao MCPM não foi possível averiguar a sua distribuição granulométrica porque quando a amostra era colocada no *gobelet* em água para ser analisada, dissolvia-se. Assim, foi feita uma estimativa do diâmetro médio dos pós por observação ao microscópio ótico e procedeu-se à sua moagem. A moagem traduziu-se numa diminuição de pós de  $(100 \pm 50) \mu\text{m}$  para  $(10 \pm 5) \mu\text{m}$ . A brushite foi depois obtida a partir dos pós de tamanho mais reduzido do MCPM e tentou-se de novo proceder à impregnação das membranas com e sem tratamento com NaOH. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.13. Embora, após a diminuição dos pós, tenha ocorrido um aumento do peso das membranas tratadas com NaOH ligeiramente superior, o resultado ainda se afigurou insuficiente para estabilizar a membrana. O tamanho de pós mais reduzido permite que trespassem mais facilmente devido ao tamanho reduzido dos poros das membranas em questão.

Tabela 5.13: Pesagem das membranas com e sem tratamento com NaOH antes e depois da impregnação com pós de tamanho mais reduzido e respetiva infiltração.

	Massa inicial (mg)	Massa final (mg)	% (Infiltração)
<b>Sem tratamento NaOH</b>			
PCL_0H	$6,2 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,4$
PCL_2H	$5,9 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,7$
PCL_4H	$5,7 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,6$
<b>Com tratamento NaOH</b>			
PCL_0H	$6,1 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,1$	$9,0 \pm 0,2$
PCL_2H	$5,8 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$	$9,3 \pm 0,4$
PCL_4H	$5,5 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1$	$9,8 \pm 0,3$

Tendo em conta que a impregnação será mais eficiente se os poros forem maiores e admitindo que os poros de fibras de maior diâmetro médio originarão matrizes com poros maiores voltou-se a considerar a utilização das membranas produzidas a partir da solução de PCL em clorofórmio. Apesar destas poderem possuir poros de maiores dimensões, a oclusividade das membranas não deverá ficar comprometida se a brushite ficar realmente infiltrada nos poros. Procedeu-se assim à impregnação da brushite em membranas produzidas a partir de soluções de 10% e 15% de PCL em clorofórmio (Clor.10% e Clor.15%, respetivamente). Tendo em conta o estudo da variação dos parâmetros apresentado na seção 5.1, estabeleceram-se os seguintes parâmetros para a produção destas fibras com maiores diâmetros: caudal 0,5 ml, distância agulha-coletor 25 cm e tensão 13 kV.

A impregnação das membranas obtidas a partir das soluções de PCL em clorofórmio, não resultou numa camada superficial de brushite desintegrável quando se manipulou a membrana. Neste sentido, a massa final da amostra impregnada calculada corresponde à conjugação da brushite infiltrada e da camada superficial. Este facto explica o aumento significativo da massa das membranas documentado na tabela 5.14.

Tabela 5.14: Pesagem das membranas de PCL obtidas a partir de soluções de PCL dissolvido em clorofórmio tratadas com NaOH e impregnadas com pós de tamanho mais reduzido e respetiva infiltração.

	Massa inicial (mg)	Massa final (mg)	% (Infiltração)
<b>Sem tratamento NaOH</b>			
<b>Clor.10%</b>	12,5 ± 0,1	112,6 ± 0,1	*
<b>Clor.15%</b>	11,5 ± 0,1	131,8 ± 0,1	*
<b>Com tratamento NaOH</b>			
<b>Clor.10%</b>	12,1 ± 0,1	132, ± 0,1	*
<b>Clor.15%</b>	11,8 ± 0,1	148,6 ± 0,1	*

\* Não é possível calcular a %(infiltração) real porque existe uma camada superficial de brushite que está contabilizada na pesagem final

### 5.4.3 SEM

Para verificar se é perceptível alguma infiltração da brushite nas membranas Clor.10% e Clor.15%, com e sem tratamento de NaOH, observaram-se as mesmas em SEM. Apesar destas imagens só permitirem observar a primeira camada de material da amostra, onde há poros é possível inspecionar se para lá do poro se observa brushite. As imagens obtidas correspondentes à fiação das soluções de 10% e 15% de PCL dissolvido em clorofórmio apresentam-se nas Figuras 5.23 e 5.24, respetivamente.

Pode-se constatar que em ambos os casos ocorreu alguma infiltração da brushite nas membranas. Na Figura 5.23, essa infiltração é visível na membrana com tratamento (à direita). Na Figura 5.24 parece haver brushite impregnada em ambas as situações. Estas observações parecem corroborar as hipóteses: quanto maior o diâmetro das fibras, mais facilmente a brushite se incorporará na membrana e essa incorporação será mais significativa para membranas de PCL que foram tratadas previamente com NaOH.

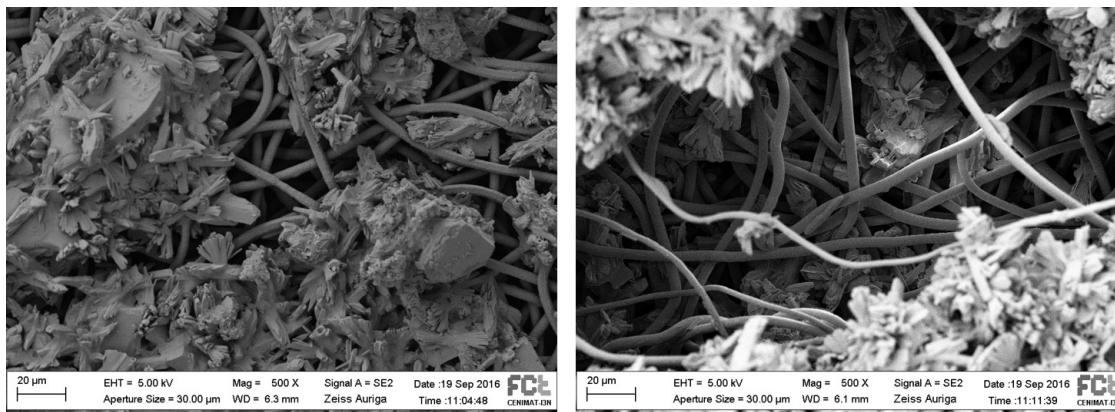


Figura 5.23: Imagem de SEM das membranas Clor.10%. À esquerda apresenta-se a membrana sem tratamento de NaOH e à direita a membrana sujeita a tratamento com NaOH.

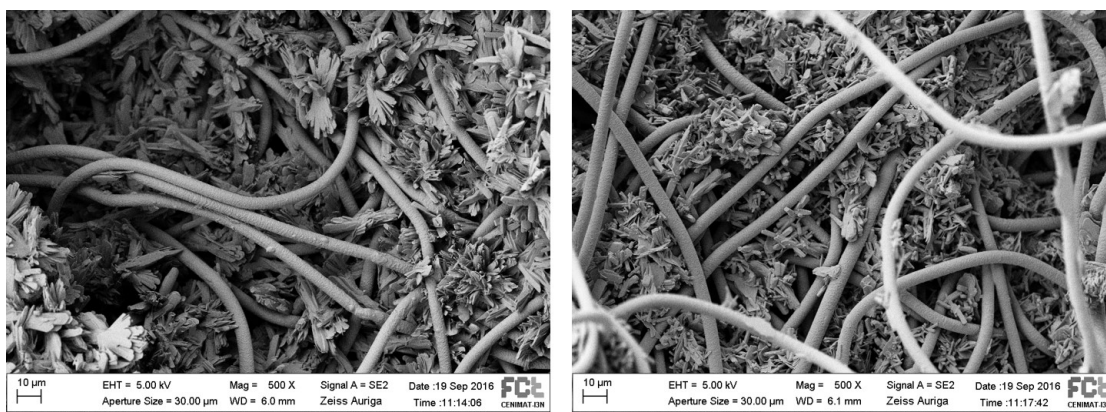


Figura 5.24: Imagem de SEM das membranas Clor.15%. À esquerda apresenta-se a membrana sem tratamento de NaOH e à direita a membrana sujeita a tratamento com NaOH

## CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho, inserido na área dos Biomateriais e Engenharia de Tecidos, teve como principal objetivo a obtenção de uma membrana oclusiva polimérica biodegradável capaz de fixar estruturalmente a membrana após a sua adaptação ao contorno anatómico do defeito ósseo. Este estudo contemplou 3 fases: obtenção de uma membrana oclusiva de PCL, através da técnica de eletrofiação; produção de um cimento de brushite que possa conferir estabilidade estrutural e mecânica à membrana; incorporação da brushite na membrana oclusiva.

A primeira fase da investigação incidiu sobre a parametrização das condições de produção das membranas de PCL em clorofórmio. Concluída esta etapa, verificou-se que as fibras obtidas tinham diâmetros demasiado grandes, o que contribuiu para que os poros sejam de maiores dimensões e a membrana menos oclusiva. A eletrofiação de soluções de PCL dissolvidas em ácido acético com água (0, 2 e 4%) permitiu obter fibras mais finas, com uma gama de diâmetros que depende da quantidade de água na solução. Foram estas as soluções usadas para produzir as matrizes estudadas ao longo desta dissertação.

A análise morfológica evidenciou a diminuição do diâmetro das fibras com o aumento da quantidade de água presente na solução. A introdução de água na solução originou fibras com valores de porosidade, grau de cristalinidade e módulo de Young maiores. O aumento é proporcional à quantidade de água presente na solução.

As membranas eletrofiadas revelam elevada porosidade, registando-se um ligeiro aumento para as membranas PCL23\_2 e PCL23\_4, relativamente à PCL23\_0.

Através do DSC, verificou-se que a temperatura de fusão obtida (61,2-62,1°) está em concordância com a literatura e calculou-se o grau de cristalinidade das 3 membranas em estudo que aumenta na seguinte ordem: PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4.

As propriedades mecânicas das membranas, avaliadas através dos ensaios de tração, permitiram observar que o módulo de Young e a tensão de cedência aumentam com a quantidade de água presente na solução eletrofiada.

A estabilidade das membranas oclusivas biodegradáveis deve manter-se durante um período de 4-6 semanas, para que a regeneração seja bem-sucedida. A estabilidade das membranas foi avaliada em testes de degradação em PBS, em meio enzimático e por espécies reativas de oxigénio durante 32 dias. Em geral, as membranas apresentam uma estabilidade adequada à aplicação desejada. As membranas submetidas à ação de dióxido de potássio desfizeram-se totalmente ao fim dos 32 dias mas a concentração utilizada no teste foi excessiva em comparação com o que se poderá encontrar em meio fisiológico. Estes testes deveriam ser repetidos por forma a mimetizar melhor as condições encontradas no meio oral.

Os cimentos de brushite produzidos foram avaliados relativamente ao seu tempo de presa, à coesão, alterações estruturais por DRX e citotoxicidade. Verificou-se que as propriedades variam consoante PLR utilizada, a composição da fase líquida e a presença de aditivos. O tempo de presa é tanto maior quanto menor PLR. A presença de pirofosfato de cálcio aumenta o tempo de presa; o PEG a 5% e 10% aumentaram o tempo de presa em alguns casos, mas esse aumento não é consistente. O ácido cítrico possui um poder de retardação mais elevado que o ácido málico. Das composições estudadas, 10 correspondiam aos requisitos exigidos para o tempo de presa para esta aplicação em específico.

O teste de coesão permitiu avaliar qualitativamente e quantitativamente a desintegração sofrida pelos cimentos produzidos. Para cimentos produzidos com ácido cítrico observou-se erosão superficial, registando-se uma diminuição de cerca de 20% do seu diâmetro, ao fim de 32 dias. A percentagem de perda de massa mais significativa processou-se ao 2º dia de teste devido ao MCPM não reagido. Em todos os casos, o ácido málico e uma menor concentração de ácido (no caso do ácido cítrico) originam perdas de massa menores. Conclui-se que a presença de PEG na composição origina cimentos mais coesos.

O estudo da estrutura cristalográfica dos cimentos antes e depois de terem sido submetidos ao teste de coesão durante 32 dias foi avaliada pela análise do DRX. Os cimentos que não estiveram em contacto com o PBS apresentam na sua maioria a presença de brushite ( 70%) e MCPM ( 30%). Após serem submetidos ao teste de coesão durante 32 dias, a monetite é a principal estrutura presente nos cimentos, o que significa que a brushite presente nos cimentos é convertida em monetite no decorrer do teste.

Os testes de citotoxicidade permitiram observar uma severa citotoxicidade, nas primeiras 24 horas de lixiviação. Essa citotoxicidade desaparece para intervalos de tempo subsequentes. Futuramente, propõe-se realizar testes de citotoxicidade com massa e área superficial das amostras lixiviadas menores por forma a ter uma maior correspondência às utilizadas para a fixação da membrana. A área superficial testada ser superior à de utilidade prática traduz-se numa majoração dos efeitos citotóxicos.

---

A fase final da dissertação consistiu na impregnação da brushite otimizada na membrana oclusiva. Inicialmente, não se observou resultados satisfatórios visto que a brushite não infiltrava as membranas PCL23\_0, PCL23\_2 e PCL23\_4. Face ao insucesso registado, estas membranas foram tratadas com NaOH para aumentar a sua hidrofiliidade e o MCPM foi moído. Ao que tudo indica, o maior entrave para a impregnação era o diâmetro médio das fibras ser demasiado pequeno. Para testar esta hipótese, impregnou-se a brushite em membranas com diâmetros maiores, Clor.10% e Clor.15%, otimizadas na primeira fase da investigação. Através da observação das imagens de SEM, concluiu-se que é possível incorporar a brushite nas membranas com maiores diâmetros e que se a brushite permanecer aderida às fibras, constitui uma barreira oclusiva. A infiltração pareceu maior para as membranas Clor.15% sujeitas ao tratamento com NaOH. As membranas ganharam integridade com a incorporação da brushite, um dos objetivos propostos inicialmente. Posto isto, pode-se concluir que os objetivos iniciais foram cumpridos e que se provou que é possível impregnar a brushite na membrana oclusiva por forma a aumentar a sua estabilidade aquando da colocação no defeito ósseo.

A otimização de um produto é um processo moroso, principalmente em casos que dependem de diversos fatores, como é o caso do cimento de brushite e da sua posterior colocação numa membrana produzida previamente. Um produto desenvolvido para aplicações médicas, principalmente para ficar em contacto com feridas abertas, exige uma caracterização exigente por forma a que sejam minorados efeitos secundários indesejados.

Para que a ideia desenvolvida ao longo desta dissertação seja futuramente conseguida para aplicações clínicas, é necessário proceder-se a uma série de estudos e otimizações. Como perspetivas futuras, propõe-se as seguintes medidas:

- Uma das principais dificuldades da impregnação da brushite na membrana é o tamanho reduzido de poros relativamente ao tamanho dos pós que originam a brushite. Uma das possíveis soluções é utilizar um moinho de bolas com um poder de moagem superior ao utilizado, para permitir moer pós menores do que  $5 \mu\text{m}$ . Caso a moagem não resulte, é possível utilizar fibras de maiores diâmetros, desde que se assegure que a brushite não se desintegra e a membrana assegure oclusividade;
- As membranas obtidas a partir da solução de PCL em clorofórmio deveriam ser caracterizadas com especial foco na observação morfológica, testes de tração e testes de degradação. É necessário adequar as concentrações usadas para a degradação por espécies reativas e utilizar mais réplicas para se obter uma estatística mais significativa. Os testes de tração são importantes para conhecer as propriedades mecânicas (nomeadamente o módulo de Young e a tensão de rutura), mas para o local de aplicação da membrana não se exige uma membrana que suporte grandes cargas porque não estará sujeita às mesmas;

- A brushite produzida apresenta um tempo de presa adequado para a sua aplicação. No entanto, a perda de massa, avaliada pelo teste de coesão, é superior à desejada em algumas situações. Pode-se incorporar novos agentes coesivos na sua composição, como o ácido hialurónico ou o hidroxipropilmetilcelulose, para diminuir a desintegração observada e, posteriormente, avaliar a sua influência na citotoxicidade;
- O teste de coesão foi realizado apenas aos cimentos de brushite e envolvendo uma área superficial generosamente superior à necessária para conferir integridade à membrana; posteriormente, propõe-se a realização de um teste de coesão à membrana impregnada com a brushite que corresponderá à situação esperada e permitirá ter uma noção mais real do que acontece;
- Da mesma forma, o teste de citotoxicidade também envolveu uma área superficial do cimento maior que a necessário, o que pode afetar o potencial citotóxico da membrana. Sabe-se que a grande parte da citotoxicidade inicial advém da libertação de ácido aquando da produção da brushite, pelo que se torna importante tentar minimizar essa libertação, quer seja através da redução da concentração de ácido, quer seja através da monitorização da variação do pH ao longo da reação para perceber quando ocorre os picos de diminuição de pH;
- Quando submetida ao teste de coesão, a brushite é convertida em monetite, o que pode afetar o seu desempenho, principalmente mecanicamente. Seria importante perceber quando e como se processa esta conversão. Uma das estratégias, é analisar por DRX as amostras imersas de PBS entre pesagens, em vez de apenas no final do teste.

Este estudo encontra-se numa fase preliminar e, como seria de esperar, com bastantes arestas para limar. Todavia, provou-se a possibilidade de incorporar um cimento numa membrana oclusiva. Com persistência e empenho, a seu tempo, acredito que o objetivo final será alcançado com sucesso.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] C. van Blitterswijk, P. Thomsen, J. Hubbell, R. Cancedda, J. de Bruijn, A. Lindahl, J. Sohier e D. Williams. *Tissue Engineering*. Elsevier Inc., 2008. Cap. 1.
- [2] M. C. Bottino e V. Thomas. "Membranes for periodontal regeneration-a materials perspective". Em: *Biomaterials for Oral and Craniomaxillofacial Applications*. Vol. 17. Karger Publishers, 2015, pp. 90–100.
- [3] R. L. Sakaguchi e J. M. Powers. *Craig's restorative dental materials*. 2012. Cap. 15.
- [4] F.-M. Chen, J. Zhang, M. Zhang, Y. An, F. Chen e Z.-F. Wu. "A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine". Em: *Biomaterials* 31.31 (2010), pp. 7892–7927.
- [5] G. Sam e B. R. M. Pillai. "Evolution of Barrier Membranes in Periodontal Regeneration - "Are the third Generation Membranes really here?"". Em: *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 8.12 (2014), ZE14.
- [6] Y. D. Rakhmatia, Y. Ayukawa, A. Furuhashi e K. Koyano. "Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications". Em: *Journal of prosthodontic research* 57.1 (2013), pp. 3–14.
- [7] J. Liu e D. G. Kerns. "Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review". Em: *The open dentistry journal* 8 (2014), p. 56.
- [8] P. Gentile, V. Chiono, C. Tonda-Turo, A. M. Ferreira e G. Ciardelli. "Polymeric membranes for guided bone regeneration". Em: *Biotechnology Journal* 6.10 (2011), pp. 1187–1197.
- [9] F. Yang, S. K. Both, X. Yang, X. F. Walboomers e J. A. Jansen. "Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application". Em: *Acta biomaterialia* 5.9 (2009), pp. 3295–3304.
- [10] N. P. Lang e J. Lindhe. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 2 Volume Set*. John Wiley & Sons, 2015.
- [11] S. V. Dorozhkin. "Bioceramics of calcium orthophosphates". Em: *Biomaterials* 31.7 (2010), pp. 1465–1485.
- [12] F. Judas, P. Palma, R. I. Falacho e H. Figueiredo. "Estrutura e dinâmica do tecido ósseo". Em: (2012).

- [13] A. Kasaj, C. Reichert, H. Götz, B. Röhrig, R. Smeets e B. Willershausen. "In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration". Em: *Head & face medicine* 4.1 (2008), p. 1.
- [14] M. C. Bottino, V. Thomas e G. M. Janowski. "A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration". Em: *Acta biomaterialia* 7.1 (2011), pp. 216–224.
- [15] S. V. Dorozhkin. "Calcium orthophosphates in dentistry". Em: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24.6 (2013), pp. 1335–1363.
- [16] M. Kikuchi, Y. Koyama, T. Yamada, Y. Imamura, T. Okada, N. Shirahama, K. Akita, K. Takakuda e J. Tanaka. "Development of guided bone regeneration membrane composed of  $\beta$ -tricalcium phosphate and poly (L-lactide-co-glycolide-co- $\epsilon$ -caprolactone) composites". Em: *Biomaterials* 25.28 (2004), pp. 5979–5986.
- [17] M. Kikuchi, Y. Koyama, K. Takakuda, H. Miyairi, N. Shirahama e J. Tanaka. "In vitro change in mechanical strength of  $\beta$ -tricalcium phosphate/copolymerized poly-L-lactide composites and their application for guided bone regeneration". Em: *Journal of biomedical materials research* 62.2 (2002), pp. 265–272.
- [18] K Fujihara, M Kotaki e S Ramakrishna. "Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers". Em: *Biomaterials* 26.19 (2005), pp. 4139–4147.
- [19] C Rey, C Combes, C Drouet e D Grossin. "Bioactive ceramics: physical chemistry". Em: *Comprehensive Biomaterials* 1 (2011), pp. 187–221.
- [20] L. L. Hench. "Bioactive ceramics". Em: *Annals of the New York academy of sciences* 523.1 (1988), pp. 54–71.
- [21] S. V. Dorozhkin. "Calcium orthophosphate cements and concretes". Em: *Materials* 2.1 (2009), pp. 221–291.
- [22] F. Tamimi, Z. Sheikh e J. Barralet. "Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite". Em: *Acta biomaterialia* 8.2 (2012), pp. 474–487.
- [23] S. Deb. *Orthopaedic bone cements*. Elsevier, 2008, pp. 206–223.
- [24] Z. Huan e J. Chang. "Novel bioactive composite bone cements based on the  $\beta$ -tricalcium phosphate–monocalcium phosphate monohydrate composite cement system". Em: *Acta biomaterialia* 5.4 (2009), pp. 1253–1264.
- [25] F Tamimi-Marino, J Mastio, C Rueda, L Blanco e E López-Cabarcos. "Increase of the final setting time of brushite cements by using chondroitin 4-sulfate and silica gel". Em: *Journal of materials Science: Materials in medicine* 18.6 (2007), pp. 1195–1201.
- [26] J. Zhang, W. Liu, V. Schnitzler, F. Tancret e J.-M. Bouler. "Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties". Em: *Acta biomaterialia* 10.3 (2014), pp. 1035–1049.

- [27] F. Theiss, D. Apelt, B. Brand, A. Kutter, K. Zlinszky, M. Bohner, S. Matter, C. Frei, J. A. Auer e B. Von Rechenberg. "Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement". Em: *Biomaterials* 26.21 (2005), pp. 4383–4394.
- [28] K. Lilley, U Gbureck, A. Wright, J. Knowles, D. Farrar e J. Barralet. "Brushite cements from polyphosphoric acid, calcium phosphate systems". Em: *Journal of the American Ceramic Society* 90.6 (2007), pp. 1892–1898.
- [29] S. Pina e J. M. Ferreira. "Brushite-forming Mg-, Zn-and Sr-substituted bone cements for clinical applications". Em: *Materials* 3.1 (2010), pp. 519–535.
- [30] M Bohner, H. Merkle, P Van Landuyt, G Trophardy e J Lemaitre. "Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement". Em: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 11.2 (2000), pp. 111–116.
- [31] M. H. Alkhraisat, F. T. Marino, J. R. Retama, L. B. Jerez e E López-Cabarcos. "Beta-tricalcium phosphate release from brushite cement surface". Em: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 84.3 (2008), pp. 710–717.
- [32] M. Alkhraisat, C Rueda, F. Marino, J Torres, L. Jerez, U Gbureck e E. Cabarcos. "The effect of hyaluronic acid on brushite cement cohesion". Em: *Acta biomaterialia* 5.8 (2009), pp. 3150–3156.
- [33] J. Engstrand, C. Persson e H. Engqvist. "The effect of composition on mechanical properties of brushite cements". Em: *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 29 (2014), pp. 81–90.
- [34] M. Roy, K. DeVoe, A. Bandyopadhyay e S. Bose. "Mechanical property and in vitro biocompatibility of brushite cement modified by polyethylene glycol". Em: *Materials Science and Engineering: C* 32.8 (2012), pp. 2145–2152.
- [35] B. Han, P.-W. Ma, L.-L. Zhang, Y.-J. Yin, K.-D. Yao, F.-J. Zhang, Y.-D. Zhang, X.-L. Li e W. Nie. " $\beta$ -TCP/MCPM-based premixed calcium phosphate cements". Em: *Acta biomaterialia* 5.8 (2009), pp. 3165–3177.
- [36] S Chauhan, M. Hofmann e R. Shelton. "Effect of protein addition on the setting behaviour of a calcium phosphate cement". Em: *Key Engineering Materials*. Vol. 309. Trans Tech Publ. 2006, pp. 841–844.
- [37] S. Dumitriu. *Polymeric biomaterials: Structure and Function*. CRC Press, 2001.
- [38] J. M. Estellés, A. Vidaurre, J. M. M. Duenas e I. C. Cortázar. "Physical characterization of polycaprolactone scaffolds". Em: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19.1 (2008), pp. 189–195.
- [39] T. K. Dash e V. B. Konkimalla. "Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review". Em: *Journal of Controlled Release* 158.1 (2012), pp. 15–33.

- [40] A Cipitria, A Skelton, T. Dargaville, P. Dalton e D. Hutmacher. "Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review". Em: *Journal of Materials Chemistry* 21.26 (2011), pp. 9419–9453.
- [41] M. A. Woodruff e D. W. Hutmacher. "The return of a forgotten polymer —polycaprolactone in the 21st century". Em: *Progress in Polymer Science* 35.10 (2010), pp. 1217–1256.
- [42] S. R. Baker, S. Banerjee, K. Bonin e M. Guthold. "Determining the mechanical properties of electrospun poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique". Em: *Materials Science and Engineering: C* 59 (2016), pp. 203–212.
- [43] F. J. Buchanan. *Degradation rate of bioresorbable materials: Prediction and evaluation*. Elsevier, 2008. Cap. 3.
- [44] M. d. S. Fernandes. *Membranas de policaprolactona e quitosano para aplicação estomatológica*. 2011.
- [45] J. L. Ferreira, S. Gomes, C. Henriques, J. P. Borges e J. C. Silva. "Electrospinning polycaprolactone dissolved in glacial acetic acid: Fiber production, nonwoven characterization, and in vitro evaluation". Em: *Journal of Applied Polymer Science* 131.22 (2014).
- [46] S. Agarwal, A. Greiner e J. H. Wendorff. "Electrospinning of manmade and biopolymer nanofibers—progress in techniques, materials, and applications". Em: *Advanced Functional Materials* 19.18 (2009), pp. 2863–2879.
- [47] A. Baji, Y.-W. Mai, S.-C. Wong, M. Abtahi e P. Chen. "Electrospinning of polymer nanofibers: effects on oriented morphology, structures and tensile properties". Em: *Composites science and technology* 70.5 (2010), pp. 703–718.
- [48] S. Agarwal, J. H. Wendorff e A. Greiner. "Use of electrospinning technique for biomedical applications". Em: *Polymer* 49.26 (2008), pp. 5603–5621.
- [49] N. Bhardwaj e S. C. Kundu. "Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique". Em: *Biotechnology advances* 28.3 (2010), pp. 325–347.
- [50] L. H. Sperling. *Introduction to physical polymer science*. John Wiley & Sons, 2005, pp. 262–270.
- [51] W. Sichina et al. "DSC as problem solving tool: measurement of percent crystallinity of thermoplastics". Em: *Thermal Analysis Application Note* (2000).
- [52] C Eldsäter, B Erlandsson, R Renstad, A.-C. Albertsson e S Karlsson. "The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly ( $\epsilon$ -caprolactone)". Em: *Polymer* 41.4 (2000), pp. 1297–1304.
- [53] S. V. Canevarolo Jr. "Ciência dos polímeros". Em: *Artiliber editora, São Paulo* (2002), pp. 203–213.

- [54] R. Dulbecco e M. Vogt. "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses". Em: *The Journal of experimental medicine* 99.2 (1954), pp. 167–182.
- [55] C. Mohan. "Buffers". Em: *EMD Biosciences, Inc* (2003), p13.
- [56] M. Hofmann, S. Nazhat, U Gbureck e J. Barralet. "Real-time monitoring of the setting reaction of brushite-forming cement using isothermal differential scanning calorimetry". Em: *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 79.2 (2006), pp. 360–364.
- [57] S. R. R. Gomes. "Desenvolvimento de matrizes biomiméticas como substitutos de pele destinados ao tratamento de queimaduras". Tese de doutoramento. 2013.
- [58] A. G. Kanani e S. H. Bahrami. "Effect of changing solvents on poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibrous webs morphology". Em: *Journal of Nanomaterials* 2011 (2011), p. 31.
- [59] Z. Gan, Q. Liang, J. Zhang e X. Jing. "Enzymatic degradation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases". Em: *Polymer degradation and stability* 56.2 (1997), pp. 209–213.
- [60] J Haponiuk e S Karlsson. "Biodegradation of modified poly ( $\epsilon$ -caprolactone) in different environments". Em: *Polish Journal of Environmental Studies* 11.4 (2002), pp. 413–420.
- [61] A. J. Bauer, Y. Wu, J. Liu e B. Li. "Visualizing the Inner Architecture of Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-Based Biomaterials and Its Impact on Performance Optimization". Em: *Macromolecular bioscience* 15.11 (2015), pp. 1554–1562.
- [62] S. C. Woodward, P. Brewer, F Moatamed, A Schindler e C. Pitt. "The intracellular degradation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)". Em: *Journal of biomedical materials research* 19.4 (1985), pp. 437–444.
- [63] M Hofmann, K Lilley, U Gbureck e J Barralet. "Carboxylic acids as brushite bone cement setting retardants". Em: *Proceedings of the 19th european conference on biomaterials. Naples*. 2005, pp. 411–418.
- [64] K. Lilley, U. Gbureck, A. J. Wright, D. Farrar e J. Barralet. "Investigation into carboxylic acids as cement reactants". Em: *Key Engineering Materials*. Vol. 309. Trans Tech Publ. 2006, pp. 853–856.
- [65] A. Dosen e R. F. Giese. "Thermal decomposition of brushite,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  to monetite  $\text{CaHPO}_4$  and the formation of an amorphous phase". Em: *American Mineralogist* 96.2-3 (2011), pp. 368–373.





## TESTE DE CITOTOXICIDADE

### A. Teste preliminar

1. Produziu-se o cimento com a formulação PLR1,5\_AC1 como referido anteriormente nos materiais e métodos;
2. Colocou-se o cimento num *ependorf* imerso em PBS numa razão 10g/mL;
3. Após 24 horas, mediu-se o pH da solução de PBS (intervalo tempo 0-24h);
4. Lavou-se o cimento com água ultrapura e colocou-se noutra *ependorf*;
5. Após 24 horas mediu-se o pH da solução de PBS (intervalo tempo 24-48h);
6. O procedimento explicado anteriormente repetiu-se 5 vezes (0-120 h).

### B. Protocolo de esterilização de amostras

1. Colocar os cimentos previamente pesados (6 condições) dentro de tubos esterilizados;
2. Colocar etanol a 70% (v/v) em cada tubo e deixar atuar durante 15 a 30 minutos;
3. Aspirar o etanol e deixar os frascos abertos dentro da câmara de cultura durante 1 a 2 h;
4. Lavar com 1 mL de PBS estéril e aspirar novamente.

### **C. Obtenção extratos de brushite**

1. Nos frascos onde se realizou o protocolo de esterilização, colocar os cimentos (6 condições = 6 tubos);
2. Colocar DMEM sem soro no tubo contendo o cimento numa razão de 1 g para 2,5 mL;
3. Passado 24 horas retirar o cimento do frasco (o meio de cultura onde permaneceu o cimento corresponde ao extrato do primeiro período – T1);
4. Lavar o cimento com DMEM sem soro, aspirar e voltar a colocar DMEM sem soro, onde permanecerá por mais um período de 24 horas (extrato do segundo período – T2);
5. Este procedimento repetiu-se 4 vezes, originando os extratos T1, T2, T3 e T4.

### **D. Protocolo de tripsinização**

1. Remover meio do T25 sem tocar na camada de células;
2. Lavar células com 5 ml PBS;
3. Pipetar 500  $\mu$ l de tripsina para o T25;
4. Colocar o T25 a incubar a 37°C durante 5 minutos;
5. Verificar se as células se encontram em suspensão através do microscópio invertida (Nikon Eclipse Ti-S);
6. Adicionar 5 ml de DMEM ao T25;
7. Transferir suspensão de células para um tubo de falcon e resuspender.

### **E. Protocolo de contagem de células**

1. Preparar o hemocitómetro;
2. Pipetar 100  $\mu$ l da suspensão de células acabada de suspender para um microtubo;
3. Adicionar 100  $\mu$ l de azul tripano e voltar a suspender;
4. Preencher as câmaras do hemocitómetro com suspensão celular;
5. Observar no microscópio invertido a grelha do hemocitómetro e proceder à contagem de células viáveis;

- 
6. Calcular a concentração celular (células/ml).

#### **F. Sementeira**

1. A sementeira efetuou-se com uma densidade de 25K células/cm;
2. Após a sementeira, colocou-se nos poços indicados cada um dos extratos correspondentes às diferentes condições (3 réplicas para cada condição), para os 4 intervalos de tempos;
3. No controlo positivo, colocou-se 10% DMSO (para inviabilizar as células semeadas anteriormente);
4. O controlo negativo corresponde à situação em que apenas se coloca DMEM num poço com células semeadas anteriormente;
5. O controlo de meio apenas contém DMEM (sem células semeadas);
6. Posteriormente, colocar resazurina numa placa (10% resazurina em 150  $\mu$ l meio) e transferir o meio correspondente;
7. Colocar a placa a incubar na estufa de CO<sub>2</sub> (Sanyo MCO19AIC(UV)) durante 3 horas;
8. Fazer a leitura da absorvância do meio a 570 nm e 600 nm no leitor de microplacas (Biotek ELX 800 UV).



## GRÁFICOS DO DSC

Em anexo, apresenta-se os gráficos que permitiram calcular o grau de cristalização das amostras PCL\_0, PCL\_2 e PCL\_4.

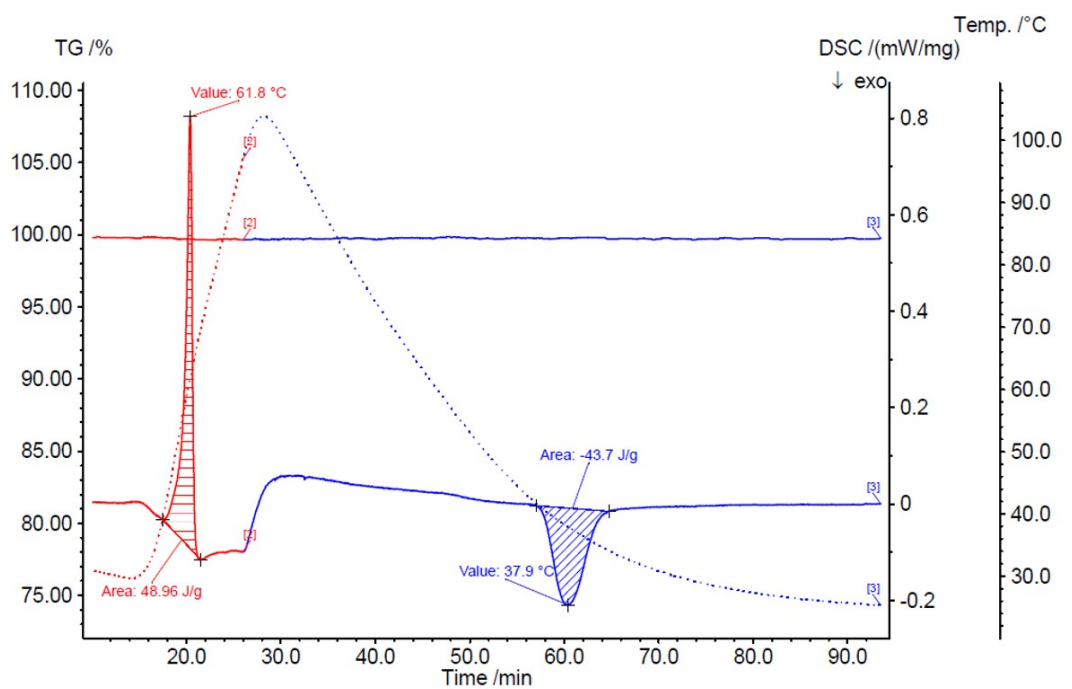


Figura B.1: Representação gráfica da análise de DSC para a amostra PCL23\_2, com a indicação do valor da temperatura de fusão (61,8°C) e da área do respetivo pico (48,49 J/g), bem como da temperatura de cristalização (37,9°C) e da área do respetivo pico (-43,7 J/g).

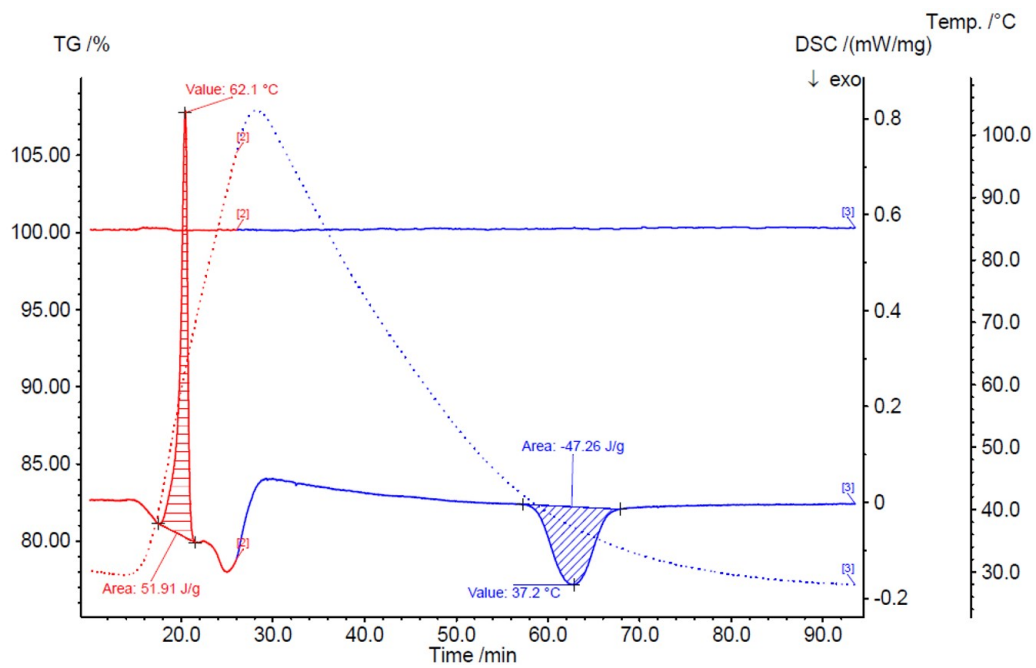


Figura B.2: Representação gráfica da análise de DSC para a amostra PCL23\_4, com a indicação do valor da temperatura de fusão (62,1°C) e da área do respetivo pico (51,91 J/g), bem como da temperatura de cristalização (37,2°C) e da área do respetivo pico (-47,26 J/g).