



Universidade de Aveiro
2016

Departamento de Engenharia de
Materiais e Cerâmica

Rita Gaspar Fonseca

**INTERACÇÕES CELULARES DE ENXERTOS
ÓSSEOS À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO**



Rita Gaspar Fonseca INTERACÇÕES CELULARES DE ENXERTOS
ÓSSEOS À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Filomena Botelho, Directora do Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Professora Catedrática da mesma Faculdade e do Doutor José Maria da Fonte Ferreira, Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo incansável apoio!

O júri

Presidente

Professor Doutor Pedro Manuel Lima Quintanilha Mantas
Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Professor Doutor José Manuel Pinto Silva Casanova
Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho
Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Agradecimentos

A elaboração da presente dissertação apenas foi possível, devido ao contributo de diversas pessoas. Por isso mesmo reservo este espaço para expressar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, os mais sinceros agradecimentos aos orientadores deste projecto. À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, orientadora principal, Directora do Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Professora Catedrática da mesma Faculdade, agradeço a oportunidade, a disponibilidade, o profissionalismo e os momentos de discussão científica que proporcionou. Ao Professor Doutor José Maria Ferreira, co-orientador deste trabalho e Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, agradeço a confiança, a disponibilidade, os ensinamentos e a amizade ao longo destes dois anos. Obrigada por sempre ter estimulado o meu interesse pelo conhecimento e pela vida académica.

À Doutora Mafalda Laranjo pelo contributo decisivo nos estudos de impregnação de fármaco e ensaios *in vitro*. Muito obrigada por toda a disponibilidade, paciência, dedicação, profissionalismo e amizade.

À Doutora Susana Olhero, Doutora Paula Torres e às Mestres (e alunas de Doutoramento), Catarina Marques e Sofia Neto, pela disponibilidade e colaboração imprescindíveis no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Mestre João Casalta Lopes pela ajuda na análise estatística dos resultados obtidos.

Aos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar de Coimbra pela cedência de doxorrubicina.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro por toda a ajuda prestada e simpatia.

Aos meus colegas de laboratório de Aveiro e Coimbra, que tão bem me acolheram, estando sempre disponíveis para me ajudar.

A todos os meus colegas de Mestrado, muito obrigada pela convivência e amizade, em especial ao Pepe por todo o companheirismo ao longo destes dois anos. “Aveiro será sempre nosso”!

Por fim, muito obrigada, às pessoas mais importantes na minha vida: aos meus pais, aos meus irmãos, à Nonô e ao André. Aos meus pais, obrigada por serem os meus heróis, por estarem presentes em todos os momentos e por serem um exemplo de grandeza e coragem. Como prometido, agradeço em especial à minha mãe pelas remessas semanais de tupperwares. Aos meus irmãos, obrigada pelo apoio incondicional e por todo o carinho. À minha princesa Nonô, obrigada por me encher o coração, sempre que sorri com as nossas brincadeiras. E ao André, agradeço todo o carinho, a confiança, a compreensão e o sorriso contagiante. Obrigada por estares sempre comigo e por fazeres com que a distância não tenha importância.

Obrigada, do fundo do coração, a todos os que comigo percorreram este caminho!

Palavras-Chave

Fosfatos de cálcio, Grânulos porosos, Multifuncionalidade, Regeneração óssea, Doxorrubicina, Liberação controlada de fármacos, Osteossarcoma.

Resumo

Um dos objectivos da engenharia de tecidos é desenvolver materiais de preenchimento e de reparação óssea, com vista a dar resposta, entre outros, ao aumento da incidência de doenças ósseas consequente do envelhecimento da população. O uso de estruturas tridimensionais porosas e biodegradáveis, designadas por *scaffolds*, como matriz para a adesão e a proliferação celular tem sido amplamente investigada. Recentemente, os grânulos porosos têm ganho destaque na investigação, uma vez que são produzidos e aplicados nas mais diversas formas, dependendo do tecido a regenerar.

No presente trabalho, foram sintetizados diferentes pós de fosfato de cálcio, compostos por β -fosfato tricálcico puro, β -fosfato tricálcico dopado com zinco, estrôncio e manganês e uma mistura bifásica formada por hidroxiapatite e β -fosfato tricálcico. Partindo dos pós produzidos foram obtidos grânulos porosos esféricos, através do método de gelatinização ionotrópica. Os grânulos foram sujeitos a tratamentos térmicos diferentes e avaliaram-se os efeitos causados nas suas características físico-químicas. Assim obtiveram-se grânulos crus, ou seja, não sujeitos a qualquer tratamento térmico, e grânulos sinterizados a 900°C.

De modo a estudar a multifuncionalidade dos grânulos bifásicos preparados, estes foram incorporados com uma molécula terapêutica, a doxorrubicina, e foram realizados ensaios *in vitro*. A incorporação distinguiu-se pela estratégia usada: (i) os grânulos bifásicos crus com doxorrubicina (BCD) foram obtidos através da adição directa da doxorrubicina ao pó de fosfato de cálcio, seguindo-se o método de gelatinização ionotrópica; (ii) os grânulos sinterizados com doxorrubicina (BSD) foram imersos numa solução do fármaco. Verificou-se que os BSD incorporaram 30 vezes mais fármaco que os BCD, no entanto a sua libertação decorreu mais rapidamente. Os grânulos sem e com doxorrubicina foram testados em células de uma linha celular derivada de osteossarcoma humano (MNNG/HOS), com o intuito de avaliar os seus efeitos citotóxicos. Estes ensaios mostraram que os BSD inibiram significativamente a viabilidade da cultura celular, comparativamente aos BCD.

Tendo em conta as características dos grânulos produzidos e o seu desempenho *in vitro*, estes demonstraram ser materiais promissores, para aplicações na regeneração do tecido ósseo e liberação controlada de fármacos. Esta aptidão precisa de ser comprovada através da realização de mais estudos *in vitro* e *in vivo*.

Keywords

Calcium phosphates, Porous granules, Multifunctionality, Bone regeneration, Doxorubicin, Drug delivery, Osteosarcoma

Abstract

One objective of tissue engineering is the development of bone filling and repair materials to mainly address the increase in the incidence of bone diseases, as a result of an aging population. The use of porous and biodegradable three-dimensional structures, namely *scaffolds*, as a matrix for cell adhesion and proliferation has been extensively investigated. Recently, porous granules have gained prominence in the scientific community, since they are produced and applied in the most diverse forms, depending on the tissue to be regenerated.

In the present work, different calcium phosphate powders composed of pure tricalcium β -phosphate; zinc, strontium and manganese-doped tricalcium phosphate; and a biphasic mixture formed by hydroxyapatite and tricalcium β -phosphate were synthesized. Spherical porous granules were obtained from the starting powders produced, through the ionotropic gelatinization method. Granules were subjected to heat treatments and the effects in their physicochemical characteristics investigated. Raw granules (not subjected to any heat treatment) and granules sintered at 900°C were obtained.

In order to study the multifunctionality of the biphasic granules, these were incorporated with a therapeutic molecule, doxorubicin, and its performance was tested through *in vitro* assays. The incorporation was distinguished by the strategy used: (i) raw biphasic granules with doxorubicin (BCD) were obtained direct addition of doxorubicin to the calcium phosphate powder suspension, followed by the ionotropic gelatinization method; (ii) sintered granules with doxorubicin (BSD) were immersed in a solution of the doxorubicin. BSDs incorporated 30 times more drug than the BCDs, however, their release was faster. In order to evaluate their cytotoxic effects, granules with and without doxorubicin were tested on cells from a human osteosarcoma-derived cell line (MNNG / HOS). These assays showed that BSD significantly inhibited cell culture viability compared to BCD.

Regarding granules characteristics and their *in vitro* performance, these have proven to be promising materials for bone regeneration and controlled drug release applications. Further *in vitro* and *in vivo* testing is needed to verify their ability.

Índice

Índice.....	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas.....	vi
Abreviaturas.....	vii
CAPÍTULO I INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1. Introdução.....	3
1.2. Objectivos.....	4
1.3. Estrutura da Tese.....	4
CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. Tecido Ósseo.....	9
2.1.1. Macroestrutura do Tecido Ósseo.....	9
2.1.2. Microestrutura do Tecido Ósseo.....	12
2.1.3. Células Ósseas.....	13
2.1.4. Remodelação Óssea.....	14
2.2. Engenharia de Tecidos Aplicada ao Tecido Ósseo.....	16
2.2.1. <i>Scaffolds</i> para a Engenharia de Tecidos.....	16
2.2.2. Produção de <i>Scaffolds</i> os seus Requisitos.....	19
2.3. Biomateriais e Engenharia de Tecido Ósseo.....	22
2.3.1. Materiais Cerâmicos - Fosfatos de Cálcio.....	24
2.3.1.1. Hidroxiapatite.....	27
2.3.1.2. β -Fosfato Tricálcico.....	27
2.3.1.3. Fosfatos de Cálcio Bifásicos.....	28
2.3.1.4. Agentes Dopantes.....	29
2.3.1.5. Grânulos Porosos de Fosfatos de Cálcio.....	30

2.4. Libertação Controlada de Fármacos.....	32
2.4.1. <i>Scaffolds</i> para a Libertação Controlada de Fármacos	32
2.4.2. Osteossarcoma	33
2.4.3. Tratamento do Osteossarcoma - Doxorubicina	35
2.5. Interações Celulares (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	38
CAPÍTULO 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	43
3.1. Preparação e Caracterização de Pós e Grânulos de Fosfatos de Cálcio.....	45
3.1.1. Síntese de Pós de Fosfato de Cálcio.....	45
3.1.2. Caracterização dos Pós	47
3.1.3. Preparação dos Grânulos.....	48
3.1.4. Caracterização do Dispersante	51
3.1.5. Caracterização das Suspensões	51
3.1.6. Caracterização dos Grânulos.....	51
3.2. Estudos de Impregnação de Fármaco e Ensaio <i>in vitro</i>	53
3.2.1. Biocompatibilidade <i>in vitro</i> dos Grânulos em SBF.....	53
3.2.1.1. Preparação da Solução de SBF.....	53
3.2.1.2. Envelhecimento das Amostras na Solução de SBF	55
3.2.1.3. Caracterização das Amostras em SBF.....	55
3.2.2. Impregnação de DOX nos Grânulos Bifásicos.....	55
3.2.3. Curva de Calibração de DOX	56
3.2.4. Eficiência de Incorporação.....	56
3.2.5. Estudo da Libertação da Doxorubicina em PBS	57
3.2.6. Ensaio de Actividade Biológica na Linha Celular de Osteossarcoma Humano MNNG/HOS.....	57
3.2.6.1. Linha Celular e Cultura de Células.....	57
3.2.6.2. Estudos de Citotoxicidade.....	58
3.2.7. Análise Estatística.....	61

CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.1. Caracterização dos Pós.....	65
4.1.1. Difracção de Raios-X.....	65
4.1.2. Distribuição Granulométrica.....	67
4.1.3. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Difracção de Electrões Secundários (EDS).....	69
4.2. Caracterização dos Grânulos	72
4.2.1. Selecção do Dispersante e Avaliação da sua Eficácia.....	72
4.2.2. Caracterização das Suspensões	73
4.2.3. Caracterização morfológica dos grânulos.....	77
4.3. Estudos de Impregnação de Fármaco e Ensaio <i>in vitro</i>	81
4.3.1. Biocompatibilidade <i>in vitro</i> dos Grânulos em SBF.....	81
4.3.2. Estudos de Impregnação e Libertação de Doxorubicina	82
4.3.3. Ensaio de Actividade Biológica Usando Linhas Celulares Derivadas de Osteossarcoma Humano (MNNG/HOS).....	86
CAPÍTULO 5 CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS.....	91
5.1. Conclusão.....	93
5.2. Trabalhos Futuros	94
CAPÍTULO 6 BIBLIOGRAFIA.....	97
6.1. Bibliografia.....	99

Índice de Figuras

Figura 1: Desenho representativo da estrutura de um osso longo (adaptado de [10]).	10
Figura 2: Estrutura do osso trabecular e seus constituintes celulares (adaptado de [10]).	13
Figura 3: Representação esquemática do processo de remodelação óssea numa trabécula (adaptado de [15]).	15
Figura 4: Representação esquemática do processo de remodelação óssea (adaptado de [15]).	16
Figura 5: Estratégias da Engenharia de Tecidos para a reparação ou regeneração do tecido ósseo lesado (adaptado de [19]).	18
Figura 6: Distribuição das células e componentes da matriz extracelular (ECM) dependendo do tipo de estrutura do scaffold (adaptado de [26]).	21
Figura 7: Esquema dos parâmetros essenciais para a produção de scaffolds ideais aplicáveis na engenharia do tecido ósseo (adaptado de [17,19]).	22
Figura 8: Diagrama de isotérmicas de solubilidade dos diferentes fosfatos de cálcio em água (adaptado de [37]).	25
Figura 9: Esquematização do método de gelificação ionotrópica (adaptado de [55,57]).	31
Figura 10: Ilustração esquemática da entrega terapêutica <i>in situ</i> (adaptado de [39]).	33
Figura 11: Imagem representativa de um osteossarcoma na diáfise do fémur de um jovem de 17 anos (adaptado de [69]).	34
Figura 12: Diferenciação das MSCs em múltiplas linhagens, tais como miócitos, adipócitos, condrócitos e osteócitos (adaptado de [71]).	35
Figura 13: Histologia do osteossarcoma antes (a) e depois (b) da quimioterapia pré-operatória (boa resposta) (adaptado de [75]).	36
Figura 14: Mecanismo de acção da DOX (adaptado de [78,79]).	37
Figura 15: Estrutura molecular da doxorubicina (adaptado de [80]).	38
Figura 16: Evolução da regeneração óssea utilizando grânulos porosos esféricos e irregulares (adaptado de [83]).	40
Figura 17: Esquema representativo do processo de síntese de pós.	46
Figura 18: Etapas efectuadas após a síntese de pós.	47
Figura 19: Esquema alusivo ao processo de preparação de suspensões	49
Figura 20: Método de gelificação ionotrópica.	49
Figura 21: Esquema ilustrativo das diferentes composições e diâmetros dos grânulos preparados.	51

Figura 22: Esquema referente à composição de grânulos escolhida para os estudos de impregnação de DOX e ensaios <i>in vitro</i>	53
Figura 23: Reacção de redução metabólica de MTT em formazano (adaptado de [91]).	59
Figura 24: Etapas efectuadas para os ensaios de actividade metabólica, usando células da linha celular derivada de osteossarcoma humano (MNNG/HOS).....	61
Figura 25: Difractogramas da composição de β -TCP puro, β -TCP dopada e bifásica (HA e β -TCP) e os padrões de DRX para as fases HA, CPP e β -TCP.....	66
Figura 26: Distribuição diferencial do tamanho de partícula dos pós puro, dopado e bifásico.....	68
Figura 27: Imagens de SEM das partículas de pó puro, dopado e bifásico (c).....	70
Figura 28: Espectro de EDS do pó puro.....	70
Figura 29: Espectro de EDS do pó dopado.....	71
Figura 30: Espectro de EDS do pó bifásico.....	71
Figura 31: Medição do potencial zeta dos pós preparados sem e com polifosfato de sódio.....	73
Figura 32: Curvas de fluxo de suspensões à base de β -TCP puro.....	74
Figura 33: Curvas de fluxo de suspensões à base de β -TCP dopado.....	74
Figura 34: Curvas de fluxo de suspensões à base de fosfato de cálcio bifásico.....	75
Figura 35: Curva de fluxo de suspensões à base de β -TCP puro, β -TCP dopado e mistura bifásica.....	76
Figura 36: Capacidade de absorção (%) dos grânulos, após 2 horas em contacto com água.....	78
Figura 37: Micrografias de SEM do exterior dos grânulos crus e sinterizados das composições de β -TCP puro, β -TCP dopado e mistura bifásica, com diferentes diâmetros.....	79
Figura 38: Micrografias de SEM revelando pormenores do exterior dos grânulos crus e sinterizados.....	79
Figura 39: Micrografias de SEM revelando pormenores do interior dos grânulos sinterizados.....	80
Figura 40: Micrografias SEM dos grânulos bifásico após imersão em SBF por períodos de tempo diferentes.....	82
Figura 41: Libertação de doxorrubicina a partir dos grânulos bifásicos em PBS, após 2, 6, 24 e 48 horas.....	85
Figura 42: Actividade metabólica (%) dos grânulos bifásicos, para as diferentes concentrações de meio condicionado, durante 48 horas e 96 horas.....	87

Índice de Tabelas

Tabela 1: Propriedades mecânicas e porosidade do osso (adaptado de [16–18]).....	12
Tabela 2: Principais compostos de fosfatos de cálcio e as suas características (adaptado de [5]).....	24
Tabela 3: Ordem segundo a qual os compostos de fosfatos de cálcio se degradam em <i>in vivo</i> (adaptado de [34]).....	26
Tabela 4: Condições de síntese usadas para a preparação de pó β -TCP puro, pó β -TCP co-dopado e pó bifásico.....	46
Tabela 5: Parâmetros estudados no processo de gotejamento.....	50
Tabela 6: Composição química da solução de SBF (adaptado de [88]).....	54
Tabela 7: Concentração de iões no plasma humano simulado (SBF) e no plasma humano sanguíneo (adaptado de [88]).....	54
Tabela 8: Percentagem de fases dos pós calcinados a 800 °C, calculadas através das fases dos espectros obtidos por difracção de raios-X.....	67
Tabela 9: Tamanhos abaixo dos quais existem determinadas percentagens volumétricas (10%, 25%, 50%, 75% e 90%) de partículas na curva de distribuição cumulativa inferior, bem como o diâmetro médio e o desvio padrão para cada composição de pó estudada, após a sua calcinação e moagem.....	69
Tabela 10: Incorporação de DOX por digestão completa dos grânulos bifásicos, durante 24 horas em HCl.....	83
Tabela 11: Efeitos citotóxicos do meio condicionado na linha celular MNNG-HOS, durante 48 e 96 horas de exposição.....	88

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Al ₂ O ₃	Alumina
ATCC	<i>American Type Cell Culture Collection</i>
BC	Grânulos Bifásicos Crus sem Doxorrubicina
BCD	Grânulos Bifásicos Crus com Doxorrubicina
BCP	Fosfato de Cálcio de Bifásico (do inglês, <i>Biphasic Calcium Phosphate</i>)
BMU	Unidade Básica Multicelular (do inglês, <i>Basic Multicellular Unit</i>)
BS	Grânulos Bifásicos Sinterizados sem Doxorrubicina
BSD	Grânulos Bifásicos Sinterizados com Doxorrubicina
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CaPs	Fosfatos de Cálcio (do inglês, <i>Calcium Phosphates</i>)
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPP	Pirofosfato de Cálcio (do inglês, <i>Calcium Pyrophosphate</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>
DOX	Doxorrubicina
DRX	Difracção de Raios-X
ECM	Matriz Extracelular (do inglês, <i>Extracellular Matrix</i>)
EDS	Difracção de Electrões Secundários (do inglês, <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FBS	Soro de Bovino Fetal (do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
HA	Hidroxiapatite (do inglês, <i>hydroxyapatite</i>)
HCL	Ácido Clorídrico
IC ₅₀	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
ICDD	<i>International Center for Diffraction Data</i>
M	Molar
Mn	Manganês
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol2-il)-2,5- Difeniltetrazólio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaPO ₃	Polifosfato de Sódio

NaPO ₃	Polifosfato de Sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
P	Fósforo
PBS	Solução Salina de Tampão Fosfato (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDF	<i>Powder Diffraction Files</i>
SBF	Plasma Humano Simulado (do inglês, <i>Simulated Body Fluid</i>)
SD	Desvio Padrão (do inglês, <i>Standard Deviation</i>)
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento (do inglês, <i>Scanning Electronic Microscopy</i>)
Sr	Estrôncio
Zn	Zinco
ZrO ₂	Zircónia
α-TCP	Alfa-Fosfato Tricálcico (do inglês, <i>alpha-tricalcium phosphate</i>)
β-TCP	Beta-fosfato de Tricálcico (do inglês, β-TCP, do inglês <i>beta-tricalcium phosphate</i>)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

1.1. Introdução

“We’ve got to learn how to build machines, materials, and devices with the ultimate finesse that life has always used: atom by atom, on the same nanometer scale as the machinery in living cells.”

Richard Smalley
Prémio Nobel da Química, 1995

O tecido ósseo possui funções essenciais no corpo humano, por isso qualquer alteração existente na sua estrutura, causada por doenças ou danos, altera drasticamente o equilíbrio corporal e a qualidade de vida do indivíduo.¹

A presença de uma população envelhecida, devido ao aumento da esperança média de vida, levou ao incremento de doenças músculo-esqueléticas degenerativas e inflamatórias. Estima-se que mais de 100 milhões de europeus tenham problemas ósseos e espera-se que o número duplique no ano de 2020. Além disso, estima-se também um aumento da incidência de tumores malignos nos ossos, em especial dos osteossarcomas. Portanto, o tratamento de problemas ósseos representa um desafio médico e socioeconómico significativo.¹

Os materiais cerâmicos, nomeadamente, os fosfatos de cálcio, representam uma das alternativas mais promissoras para enxertos ósseos. A síntese, a dopagem e a combinação de materiais como, a hidroxiapatite (HA, do inglês *hydroxyapatite*) e β -fosfato tricálcico (β -TCP, do inglês *beta-tricalcium phosphate*), têm sido extensivamente investigados nos últimos anos. Considera-se que estes são materiais com elevado potencial, uma vez que podem ser produzidos e aplicados nas mais diversas formas, dependendo da função e do tecido a regenerar. As suas características mais interessantes incluem: (a) a similaridade com a matriz inorgânica do osso natural; (b) a fácil formação de tecido ósseo em torno do local do implante; (c) os excelentes índices de biocompatibilidade, de biodegradação e de bioactividade; (d) as taxas de dissolução diferentes (HA apresenta uma taxa de reabsorção lenta, enquanto o β -TCP exhibe uma taxa de reabsorção rápida).^{2,3}

Os fosfatos de cálcio devem ser preparados tendo em conta as características e as propriedades ideais, que permitam a sua ligação ao tecido ósseo.⁴ O desenvolvimento de grânulos porosos permite conferir características multifuncionais e aumentar a eficácia destes materiais. Neste contexto, os grânulos porosos de fosfatos de cálcio

podem conseguir o melhor preenchimento dos defeitos ósseos, devido à sua capacidade de rearranjo espacial, bem como a terem uma taxa de reabsorção mais rápida do que os materiais densos.^{5,6} Estes materiais oferecem ainda oportunidades de funcionalização adicionais, permitindo conceber sistemas com capacidade de actuarem simultaneamente como veículos de fármacos e de os libertar *in situ* de forma controlada, acelerando o processo de regeneração óssea. A impregnação dos grânulos com doxorubicina, um antibiótico da família das antraciclina com actividade antineoplásica que se intercala no ácido desoxirribonucleico (ADN), pode ser uma alternativa para a reconstrução de defeitos ósseos associados à excisão de osteossarcomas, com o objectivo de inibir a doença com baixa toxicidade sistémica.^{4,6,7}

Os factores que regulam a capacidade de regeneração celular, bem como a adsorção e a libertação localizada de fármacos pelos grânulos porosos de fosfatos de cálcio, não são ainda completamente conhecidos. Por essa razão é importante estudar as suas características físico-químicas, morfológicas e estruturais, tais como, a estrutura cristalina, a porosidade, o tamanho de partícula e a área superficial; compreender o perfil de libertação do fármaco em causa e analisar as suas interacções celulares *in vitro*.⁷⁻⁹

1.2. Objectivos

O presente estudo tem como objectivo principal desenvolver substitutos ósseos na forma de grânulos porosos multifuncionais, ou seja, com capacidade de regeneração e de entrega controlada de fármacos *in situ*. Primeiramente, serão desenvolvidos os grânulos porosos, para se proceder à sua impregnação com doxorubicina e, por fim, será avaliada a sua biocompatibilidade *in vitro*.

1.3. Estrutura da Tese

A tese é composta por 5 capítulos. No capítulo 1 é apresentada a introdução do tema e os objectivos deste projecto. No capítulo 2 será feita uma revisão bibliográfica, para um melhor enquadramento do tema. No capítulo 3 será explicado detalhadamente o procedimento experimental executado. No capítulo 4 os resultados

obtidos e a discussão dos mesmos serão expostos. Por último, no capítulo 5 será feita uma retrospectiva de todo o trabalho desenvolvido, assim como sugestões para melhoramentos ou trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tendo em conta os objectivos do presente trabalho, importa fazer um enquadramento adequado do estado da arte relativo aos aspectos que serão focados, incluindo a estrutura dos tecidos ósseos, os seus mecanismos de remodelação, a degenerescência tecidular, a necessidade de substitutos ósseos regeneradores e a pertinência da libertação controlada de fármacos *in situ*.

2.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, que fornece um sistema de suporte interno a todos os vertebrados superiores. Dessa forma, trata-se de um tecido complexo no qual a matriz extracelular é mineralizada, conferindo acentuada rigidez e resistência ao esqueleto mantendo, porém, um certo grau de elasticidade.¹⁰

O osso desempenha diferentes funções no organismo, como a função mecânica, pois proporciona apoio aos músculos esqueléticos transformando as contracções musculares em movimentos úteis, a função protectora de órgãos vitais, como os contidos na caixa torácica, na caixa craniana e no canal raquidiano, produção de células sanguíneas a partir da medula óssea e a função metabólica, pois constitui um reservatório de iões, principalmente de cálcio e de fósforo, libertando-os de forma mais ou menos controlada, de modo a assegurar a sua concentração constante nos líquidos corporais.¹⁰

O tecido ósseo é altamente adaptável, tendo capacidade de se remodelar consoante as suas necessidades. No entanto, em alguns casos o mecanismo de remodelação não é suficiente, sendo necessário recorrer à implantação de um biomaterial de enchimento (natural ou sintético) para substituir o osso em falta e, se possível, servir de suporte a uma remodelação do próprio biomaterial com o objectivo de formar novo osso.¹¹

2.1.1. Macroestrutura do Tecido Ósseo

O corpo humano adulto é constituído por 206 ossos. Os ossos podem ser classificados macroscopicamente, quanto à sua forma, em ossos achatados (como por exemplo, os ossos do crânio, a omoplata, a mandíbula e o íliaco), ossos longos (como a

tíbia, o fémur e o úmero), ossos curtos (como o carpo e o tarso) e osso irregulares (como as vértebras).^{10,12}

Conforme representado na Figura 1, um osso longo adulto é composto por cinco partes principais: a diáfise, as metáfises e as epífises.

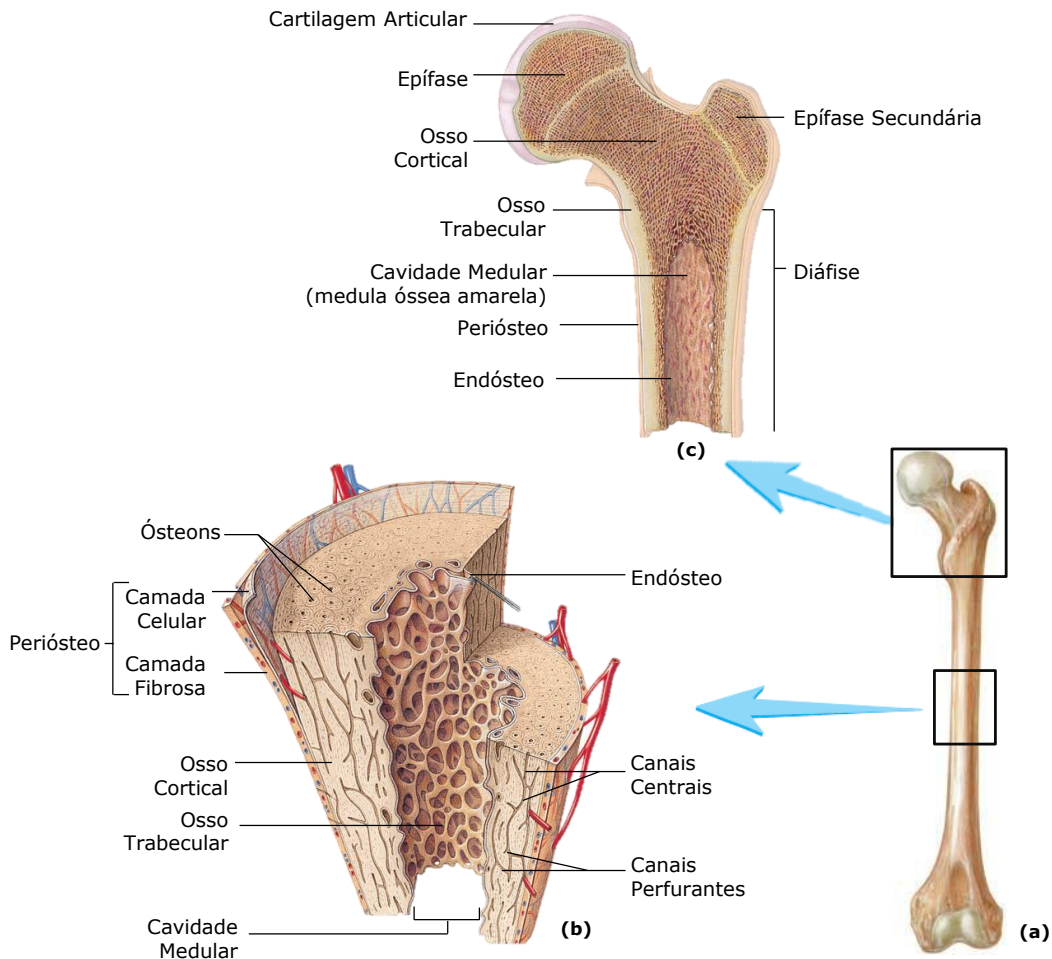


Figura 1: Desenho representativo da estrutura de um osso longo (a) e ampliações da estrutura da epífise proximal (b) e de uma secção da diáfise (c) (adaptado de [10]).

A diáfise é a região cilíndrica central enquanto as metáfises são duas, estão localizadas entre a diáfise e as epífises e asseguram o crescimento longitudinal do osso através da cartilagem de conjugação aí situada. As epífises, são igualmente duas, uma proximal e outra distal e encontram-se a seguir as metáfises, constituindo as terminações dos ossos longos. As epífises têm geralmente diâmetro transversal maior que as diáfises e estão cobertas pelas cartilagens articulares, uma vez que são sujeitas a cargas elevadas. O facto do osso epifisial e metafisial suportarem a cartilagem articular, torna a epífise e as metáfises com diâmetro transversal maior que as diáfises. Assim

sendo, a diáfise é constituída principalmente por osso compacto, também conhecido por osso cortical ou lamelar. No interior da diáfise, na cavidade medular, encontra-se a medula óssea amarela constituída principalmente por tecido adiposo. No interior das epífises existe outro tipo de tecido ósseo, o osso esponjoso também denominado como osso trabecular, de porosidade muito superior à do osso cortical.^{10,12}

O osso cortical é composto por fibras de colagénio, que se distribuem paralelamente umas às outras e estão organizadas em lamelas concêntricas, formando os osteónios (sistemas de Havers) que constituem as unidades estruturais elementares do osso compacto (Figura 1). Estes são atravessados por uma rede tridimensional de nervos e de vasos sanguíneos, que permitem o transporte de fluidos orgânicos para as componentes mais profundas do tecido. Devido à organização compacta dos osteónios, o osso cortical desempenha um papel predominante no suporte mecânico (resistência e rigidez) e na função de protecção do esqueleto. O osso cortical tem uma estrutura densa e microporosa (~10% de porosidade de diâmetro de poro de 1 a 10 μm).^{10,13,14}

O osso esponjoso é constituído por uma rede fina de estruturas ósseas denominadas por trabéculas. Nos espaços intercalares encontram-se vasos sanguíneos, que irrigam o osso e a medula óssea. Desse modo, o osso trabecular apresenta uma estrutura macro porosa (~30-90% de porosidade interligada de 200 a 400 μm), e por consequência, origina uma superfície de trocas com os fluidos biológicos que lhe confere propriedades funcionais e estruturais diferentes, nomeadamente funções metabólicas, tais como a homeostase do cálcio.^{10,13,14}

As superfícies do osso são recobertas por membranas de tecidos conjuntivos, o perióstio e o endóstio (Figura 1). Ambos possuem a função de nutrição e de fornecimento de novos osteoblastos para o crescimento e para a regeneração do osso. O perióstio reveste a superfície externa não articulada do osso. Este é composto por: (i) uma camada externa que consiste num tecido conjuntivo fibroso denso, rico em fibras de colagénio e com alguns fibroblastos, e (ii) uma camada interna constituída por células osteoprogenitoras, que se dividem por mitose e se diferenciam em osteoblastos. O perióstio possui nervos e vasos sanguíneos que transportam sangue até ao interior do osso para entrega de nutrientes, através dos canais de Volkmann. O endóstio consiste numa membrana que reveste interiormente a superfície do tecido

ósseo que forma a cavidade medular, e é formado por células osteoprogenitoras, por osteoblastos e por uma pequena quantidade de tecido conjuntivo.^{10,12}

2.1.2. Microestrutura do Tecido Ósseo

O tecido ósseo, como outros tecidos do organismo humano, é composto por células e pela matriz extracelular. A matriz extracelular óssea é constituída por aproximadamente 30% de material orgânico (principalmente colagénio e proteoglicanos), 65% de material inorgânico à base de fosfatos de cálcio e 5% de água. Estes componentes e o seu equilíbrio determinam as propriedades do osso, sendo que a componente orgânica fornece flexibilidade e resiliência, enquanto a matriz mineral confere resistência à compressão. Caso se verifique uma diminuição do teor de material inorgânico, o osso torna-se demasiado flexível e, opostamente, se ocorrer diminuição do constituinte orgânico, o osso torna-se mais rígido e quebradiço.¹⁰

O facto de o osso ser anisotrópico e um tecido altamente adaptável, as suas propriedades variam com a direcção da carga para além da variabilidade individual dependente da idade, do género e do estado de saúde.¹⁵ As diferenças entre os dois tipos de osso traduzem-se em propriedades mecânicas e características físicas distintas, em especial a porosidade, como se pode constatar pela análise da Tabela I.

Tabela I: Propriedades mecânicas e porosidade do osso (adaptado de [16–18]).

Propriedades	Tipo de Osso	
	Osso Cortical	Osso Trabecular
Resistência à Compressão (Mpa)	130-300	0,6-12
Módulo de Elasticidade (GPa)	0,5-40	0,05-0,9
Porosidade (%)	5-13	30-90

A parte mineral do osso é composta por uma apatite. Esta apatite é formada por HA pobre em cálcio, sendo diferente da HA estequiométrica $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. A apatite biológica apresenta diferentes tipos de carbonatação, que podem ocorrer em simultâneo: (i) alguns grupos hidroxilo (OH^-) são substituídos por grupos carbonato (CO_3^{2-}); e (ii) alguns grupos fosfato (PO_4^{3-}) são substituídos por grupos carbonato

(CO_3^{2-}). Além da carbonatação, a apatite óssea exibe também substituições de íons de fosfato (PO_4^{3-}) por íons hidrogenofosfato HPO_4^{2-} . A capacidade de sofrer trocas iônicas conduz à formação de uma apatite pobre em cálcio, que contém íons susceptíveis de interagir com os fluidos circundantes, como o Ca^{2+} , o HPO_4^{2-} ou o CO_3^{2-} , o que explica a variabilidade da composição óssea.⁵

2.1.3. Células Ósseas

As células ósseas têm origem nas células estaminais, mais especificamente nas células estaminais mesenquimatosas, que se podem diferenciar em diferentes tipos de células. As células ósseas são as responsáveis pelo controlo do funcionamento do osso, sendo divididas em quatro tipos distintos: os osteoblastos, os osteoclastos, os osteócitos e as células osteoprogenitoras, como se encontra apresentado na Figura 2.¹⁵

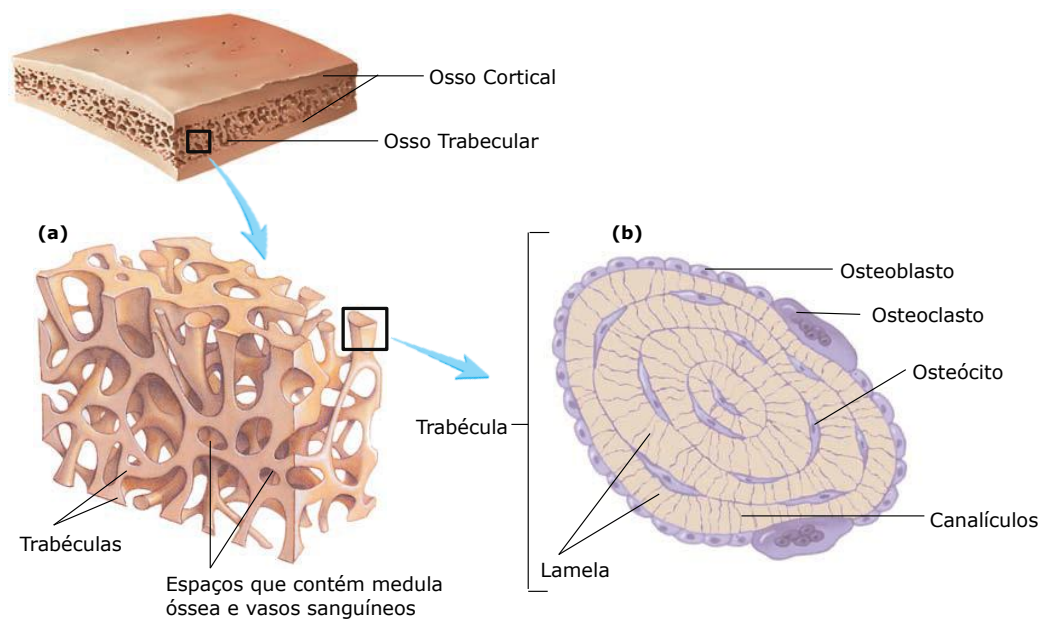


Figura 2: Estrutura do osso trabecular e seus constituintes celulares (adaptado de [10]).

Os osteoblastos são células de formação óssea, que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, composta por colagénio do tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas. Além disso, também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz, num processo denominado osteogénese (ou ossificação). Estas células possuem um sistema de comunicação intercelular semelhante ao existente entre os osteócitos. Os osteoblastos são activos durante cerca de 8 dias, período durante o qual produzem a

matriz. Após este tempo, são envolvidas pela matriz óssea, passando a denominar-se por osteócitos.¹⁰

Os osteócitos são as células maduras que mantêm a matriz óssea, sendo sensíveis a estímulos mecânicos. Durante o período de reabsorção óssea, os osteócitos são fagocitados e digeridos conjuntamente com os outros elementos constituintes do osso.^{10,15}

Por sua vez, os osteoclastos são células que reabsorvem o osso, e participam nos processos de absorção e de remodelação do tecido ósseo. É necessário existir um equilíbrio entre a actividade dos osteoclastos e dos osteoblastos, por forma a manter as propriedades do osso. Como os osteoclastos segregam substâncias ácidas, por acção enzimática, dissolvem a matriz orgânica e inorgânica óssea, formando depressões conhecidas como lacunas de Howship. Deste modo, apresentam na sua morfologia vilosidades que se encontram em contacto com o osso formado, o qual destroem para retirar o fósforo e o cálcio.^{10,15}

Por fim, as células osteoprogenitoras encontram-se indiferenciadas e localizam-se ao longo do perióstio e do endóstio, como anteriormente referido. Estas células permanecem no estado indiferenciado até receberem um estímulo adequado, que permite diferenciarem-se em osteoblastos. Como tal, desempenham um papel na coordenação da reabsorção e da formação do osso.¹⁵

2.1.4. Remodelação Óssea

O osso é um tecido ósseo que tem capacidade de remodelar continuamente durante toda a vida. A remodelação óssea é um processo dinâmico resultante de um equilíbrio entre a reabsorção e neo-formação óssea. Este processo envolve a remoção de osso velho e a formação de osso novo, através da acção dos osteoclastos e dos osteoblastos, que colaboram intrinsecamente, constituindo uma unidade básica multicelular (BMU, do inglês *basic multicellular unit*). A extremidade da unidade básica multicelular é feita de osteoclastos, que reabsorvem osso, seguido por milhares de osteoblastos que enchem o túnel (no osso cortical) ou o canal (nas trabéculas do osso esponjoso), como se pode observar na Figura 3. A unidade básica multicelular avança gradualmente através do osso, com uma velocidade de 20-40 $\mu\text{m}/\text{dia}$.^{10,15}

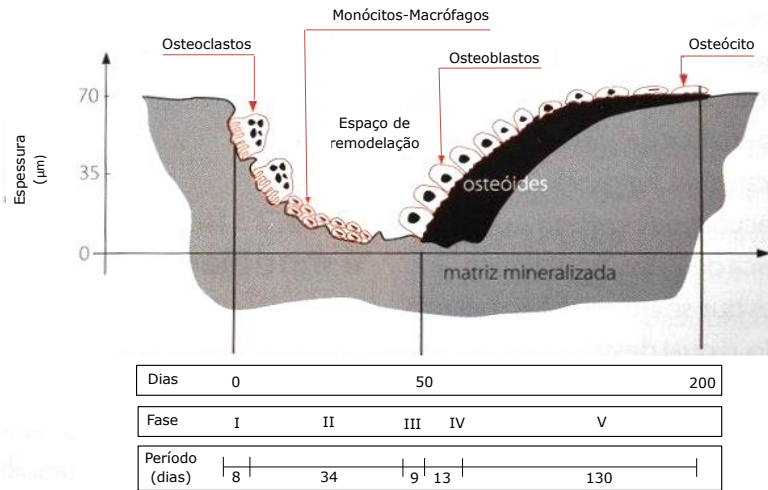


Figura 3: Representação esquemática do processo de remodelação óssea numa trabécula (adaptado de [15]).

A taxa de remodelação óssea difere ao longo da vida, sendo mais acentuada na criança. Na remodelação óssea, o processo de remoção do osso é mais rápido do que o processo de deposição (Figura 3). Desse modo, o processo de deposição pode demorar aproximadamente quatro meses, seguindo-se o processo de mineralização, com uma duração de cerca de seis meses. A mineralização ocorre maioritariamente nos primeiros dias (mineralização primária) e a restante mineralização ou mineralização secundária diminui gradualmente ao longo do tempo. Assim, num processo de remodelação ocorrem níveis diferentes de mineralização, o que influencia as propriedades mecânicas do osso. É de realçar que a maior taxa de remodelação, verificada nas crianças, torna o osso destas menos mineralizado, o que determina um módulo de elasticidade mais baixo.¹⁵

A remodelação óssea é mais activa no osso trabecular do que no osso cortical. Note-se que no homem a remodelação óssea no osso cortical é de 5% ao ano, enquanto para o osso trabecular é de 25% ao ano. Um estudo realizado sobre o período de remodelação no osso esponjoso, em 20 indivíduos normais, demonstrou que o processo de remodelação pode ser subdividido em cinco fases, nomeadamente, a fase I ou de reabsorção osteoclástica, com duração de oito dias, a fase II ou de reabsorção mononuclear, com duração de 34 dias, a fase III ou preosteoblástica, com duração de nove dias, a fase IV ou de iniciação da mineralização, com duração de 13 dias e, por fim, a fase V ou de mineralização, que dura 130 dias. Este processo corresponde a um tempo total de 196 dias (Figura 3).¹⁵

Na remodelação óssea, a formação e a reabsorção de osso não estão equilibradas, sendo que a formação de osso não é, necessariamente, precedida pela reabsorção, conforme representado na Figura 4. As células osteoprogenitoras na superfície óssea podem diferenciar-se, de novo, em osteoblastos e formar o novo osso sobre o osso antigo, enquanto os osteoclastos podem reabsorver osso sem a formação da unidade básica multicelular. Deste modo, a modelação óssea pode resultar em alterações na microestrutura do osso, da massa óssea e da forma dos ossos.¹⁵

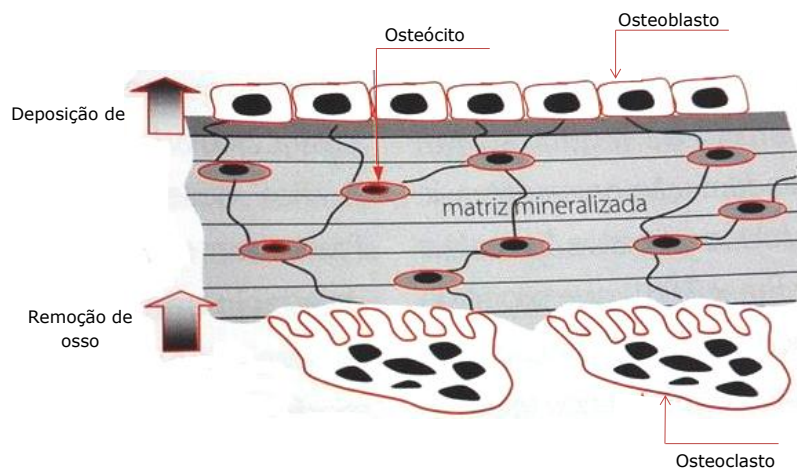


Figura 4: Representação esquemática do processo de remodelação óssea (adaptado de [15]).

2.2. Engenharia de Tecidos Aplicada ao Tecido Ósseo

2.2.1. Scaffolds para a Engenharia de Tecidos

O tecido ósseo possui funções essenciais no funcionamento do corpo humano e, portanto, é de esperar que qualquer alteração existente na sua estrutura, devido a danos ou doença, altere drasticamente o equilíbrio biológico e a qualidade de vida.¹

Devido ao aumento da esperança média de vida, e conseqüente aumento da população acima dos 65 anos, verificou-se um aumento de doenças músculo-esqueléticas. As patologias degenerativas e inflamatórias como, por exemplo, a osteoartrite, a osteoporose, os traumatismos e outras doenças ósseas estão entre as maiores causas de sofrimento, de dor aguda e de dor crónica, que afectam centenas de milhões de pessoas em todo o mundo. Estima-se que mais de 100 milhões de europeus são afectados por problemas ósseos e espera-se que a percentagem da população

afectada seja o dobro no ano de 2020. É de realçar, que o tratamento de problemas ósseos representa um desafio médico e socioeconómico significativo.¹

O osso é uma estrutura viva com capacidade de remodelação, como mencionado anteriormente. Porém, este processo ocorre quando a área da lesão é inferior ao tamanho crítico, isto é, menor tamanho para o qual o osso tem capacidade de regeneração. Quando as lesões estão acima do tamanho crítico, o processo de remodelação não é possível, sendo necessário recorrer a terapias de substituição. Aqui incluem-se os dispositivos físicos que substituem o osso ou materiais que preenchem as lesões. Enquanto os dispositivos de substituição física visam a substituição total ou parcial de uma peça anatómica, os materiais de preenchimento devem promover o crescimento do tecido ósseo, levando ao desaparecimento do local afectado.¹¹

Por conseguinte, as terapias baseadas no preenchimento de defeitos podem ser realizadas recorrendo a tecido proveniente do próprio (autoenxerto) ou recorrendo a um dador da mesma espécie (aloenxerto). No entanto, esta abordagem acarreta algumas desvantagens, tais como, o recurso a uma incisão para retirar uma porção de osso (no caso do autoenxerto) ou a rejeição imunológica (no caso dos aloenxertos).⁸

Para colmatar estas limitações, têm sido realizados esforços no âmbito da engenharia de tecidos. Segundo *Vacanti e Langer* em 1993, a engenharia de tecidos é “*um campo interdisciplinar de investigação, que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida, para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a funcionalidade dos tecidos*”.¹⁹ Estes substitutos designados por “*scaffolds*” são estruturas porosas tridimensionais, implantados *in vivo*, servem como suportes para adesão e proliferação de células, para a deposição de matriz extracelular e consequente crescimento dos tecidos.^{20,21}

A engenharia de tecidos ósseos consiste em regenerar o tecido ósseo lesado e recuperar a sua função anatómica. Para o efeito é necessária a interacção de elementos com características osteogénicas, osteoindutoras e osteocondutivas.²² Relativamente aos componentes osteogénicos, estes incluem células com capacidade para a produção de tecido ósseo mineralizado (osteogénese) como, por exemplo, os osteoblastos. Quanto aos elementos osteoindutores, estes englobam factores bioactivos que induzem o recrutamento, a diferenciação e a proliferação dos vários tipos de células adequados para a regeneração de um tecido danificado. Por último, os componentes osteocondutivos abrangem os *scaffolds*, que providenciam suporte mecânico, permitem

a proliferação e a migração celular, bem como a adsorção e a libertação de factores de crescimento.^{22,23}

A principal estratégia da engenharia de tecidos ósseos consiste em semear células osteogénicas em *scaffolds* (de origem natural ou sintética), visando corrigir o defeito existente por intermédio da capacidade regenerativa do organismo. A cultura de células osteogénicas é feita *in vitro*, sob estimulação controlada por factores de crescimento, que conduz à formação de uma nova matriz extracelular, podendo esta ser implantada no organismo (*in vivo*). Após a implantação, o processo de regeneração irá decorrer de forma natural, levando à formação de vasos sanguíneos e consequente integração do implante. À medida que o novo tecido é formado, o *scaffold* é reabsorvido gradualmente, uma vez que os seus constituintes (fosfatos de cálcio) são usados na mineralização da nova matriz. Apesar de ser a estratégia que tem demonstrado o melhor desempenho na regeneração e na cicatrização de defeitos ósseos, existem outras que são usualmente aplicadas, tais como, a implantação directa do *scaffold in vivo* e/ou implantação directa das células osteogénicas *in vivo*.^{8,24} As estratégias para a reparação ou regeneração do tecido ósseo estão esquematicamente representadas na Figura 5.

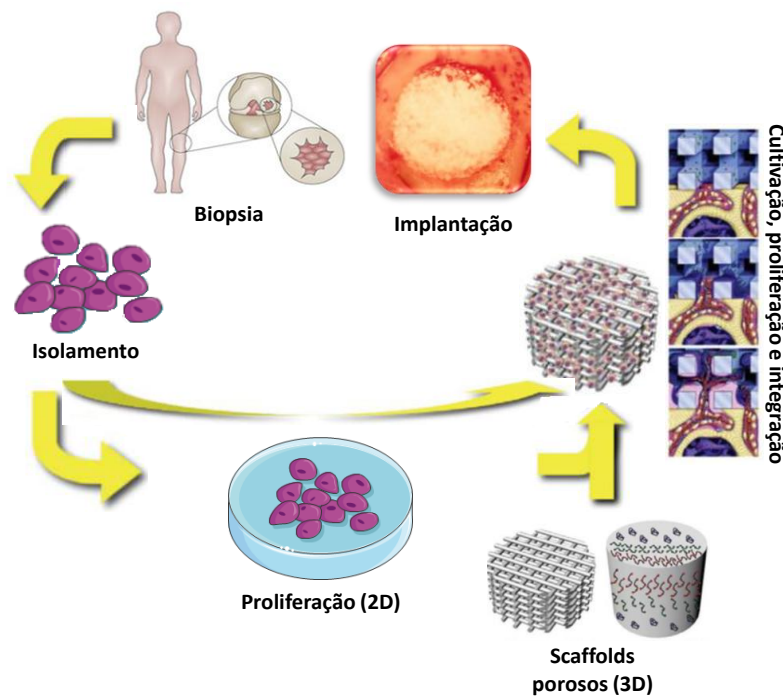


Figura 5: Estratégias da Engenharia de Tecidos para a reparação ou regeneração do tecido ósseo lesado (adaptado de [19]).

2.2.2. Produção de *Scaffolds* os seus Requisitos

Os *scaffolds* favorecem ou aceleram a proliferação celular e deposição de matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*), com consequente crescimento ósseo, até que o novo tecido seja completamente regenerado.^{19,25}

Existem alguns requisitos essenciais para a produção de *scaffolds*, de modo a assegurar as propriedades adequadas aos tecidos que se pretendem reparar. Essas propriedades não só influenciam a sobrevivência das células, a sinalização, o crescimento, a propagação e a reorganização, mas também a expressão de genes e a preservação do seu fenótipo.²⁵ Assim, são particularmente importantes características como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, a bioactividade, a osteocondução, a osteointegração, a rugosidade, a porosidade, o diâmetro de poros, as propriedades mecânicas e o processamento, conforme detalhado de seguida.

A biocompatibilidade é definida como a capacidade de um biomaterial desencadear uma resposta específica apropriada, isto é, suportar a actividade celular normal, sem qualquer efeito tóxico local ou sistémico.

A biodegradabilidade do *scaffold* deve ser controlável e compatível com o tecido ósseo a formar. Inicialmente, os *scaffolds* fornecem uma estrutura estável, para a formação do tecido, que é degradada ao longo do tempo, de forma a permitir uma transferência de carga gradual do osso. Quando o local da lesão estiver totalmente regenerado, o *scaffold* deverá estar completamente degradado. Os produtos de degradação deverão ser facilmente excretados pelo organismo e não podem ser tóxicos.

Um *scaffold* bioactivo é um material que tem a capacidade de reagir positivamente com o microambiente onde é colocado acelerando os processos de reparação tecidual. A bioactividade consiste na ligação química entre o *scaffold* e as células do osso nativo, para que seja possível a indução da formação de uma camada de hidroxiapatite carbonatada (apatite) na superfície do material, assegurando a biointegração do material.

O *scaffold* deve conter uma rede de poros tridimensionais, interligados, para promover a osteocondução, ou seja, deve permitir a migração e a proliferação celulares e a vascularização, bem como a difusão de nutrientes e a remoção dos resíduos metabólicos.

A osteointegração refere-se à formação de um vínculo entre o *scaffold* e o tecido neoformado, sem que ocorra a formação de tecido fibroso na interface implante/osso.

A rugosidade do *scaffold* influencia directamente o comportamento celular; uma superfície rugosa aumenta a proliferação e a diferenciação celulares.^{4,17,21,26}

Um *scaffold* deve possuir uma estrutura constituída por uma fracção sólida que contém espaços vazios, os poros. A porosidade e a interligação entre os poros são propriedades fundamentais que influenciam a fixação, o crescimento e a motilidade das células e, conseqüentemente, a formação de um novo tecido. A migração celular é modulada por um conjunto complexo de mecanismos biofísicos, que são influenciados pela bioquímica da sinalização extracelular e intracelular e pelo ambiente extracelular circundante. Portanto, os *scaffolds* osteogénicos devem mimetizar a morfologia, a estrutura e a função do osso com vista a otimizar a sua integração no tecido circundante.^{27,28}

Um *scaffold* ideal para o tecido ósseo deve conter uma estrutura porosa interligada com uma fracção volúmica de poros maior que 0,65, equivalente a uma porosidade de 65%.²⁹ Além disso, deve apresentar diâmetros de poros na gama dos 10–500 µm, de forma a imitar as propriedades biomiméticas do tecido a regenerar e a potenciar a osteocondução.¹⁷ As estruturas microporosas (diâmetro dos poros <50 µm) contribuem para o aumento da área superficial do *scaffold* e, conseqüentemente, intensificam fenómenos como a migração, a adesão celular e a osteointegração, como se pode observar Figura 6.^{17,26} Por outro lado, estruturas macroporosas (diâmetro dos poros >300 µm) têm uma área superficial menor, porém, como o diâmetro do poro é maior, contribui para o aumento da oxigenação e da vascularização celular, que resulta na formação de novo osso e de novos capilares (Figura 6).^{17,26,29} Assim, pequenos poros favorecem as condições de hipoxia e induzem a formação osteocondral (formação da cartilagem) antes da osteogénese, enquanto poros maiores estimulam directamente a osteogénese (sem formação inicial da cartilagem). O tamanho de poro é, pois, um parâmetro que está intrinsecamente relacionado com a vascularização do tecido. Estudos recentes indicam que os *scaffolds* que contêm porosidades tanto na escala micro como macro, podem ser mais eficazes do que apenas os *scaffolds* com uma só escala.^{21,26}

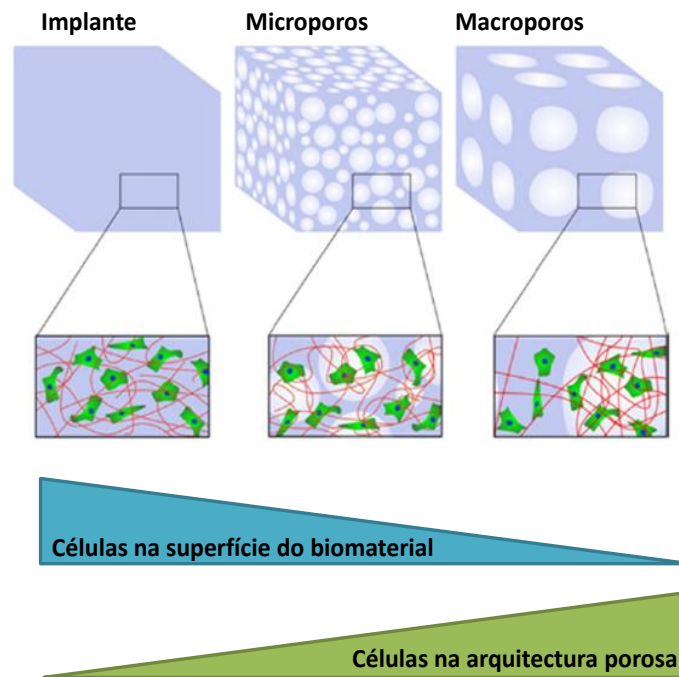


Figura 6: Distribuição das células e componentes da matriz extracelular (ECM) dependendo do tipo de estrutura do scaffold (adaptado de [26]).

A interligação dos poros influencia positivamente a taxa de deposição óssea e a integração celular, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os poros interligados proporcionam melhor permeabilidade, e permitem melhor remoção de resíduos metabólicos celulares, fornecimento de nutrientes, trocas gasosas, bem como a libertação de controlada de agentes activos, o que é essencial para melhorar a viabilidade celular. O ajuste do diâmetro do poro e a interligação necessária, para obter uma osteocondutividade ideal são aspectos importantes para a produção de *scaffolds*.^{17,27}

Apesar dos benefícios que a porosidade acarreta, o seu efeito pode limitar ou comprometer a aplicação de *scaffolds* no meio fisiológico, uma vez que à medida que a porosidade aumenta as propriedades mecânicas (resistência) dos *scaffolds* diminuem. Por isso, deve ser conseguido um equilíbrio, com o intuito de otimizar a taxa de remodelação do organismo, a taxa de degradação do material, a porosidade, a rigidez e a resistência adequada, com o fim de sustentar as cargas transmitidas por parte do osso circundante saudável, e aumentar a estabilidade e a ligação intermecânica do *scaffold* com o tecido novo.^{17,26}

As propriedades mecânicas do *scaffold* devem ser semelhantes às do osso nativo, a fim de proporcionar estabilidade estrutural no local da lesão. Neste caso, o biomaterial escolhido deve possuir resistência mecânica suficiente para suportar a carga fisiológica

do corpo e absorver os estímulos mecânicos necessários para o crescimento natural do local afectado. A compatibilidade entre as propriedades mecânicas do *scaffold* e as do tecido a regenerar é essencial para prevenir o desgaste.

Quanto ao seu processamento, este deve ser simples e adaptável para diversas formas (complexas e irregulares) e dimensões, de acordo com a geometria do defeito ósseo de cada doente. Além disso, a síntese e a fabricação dos *scaffolds* deve ser adequada para assegurar os processos de esterilização, cumprir os requisitos legais para a utilização clínica e ser capaz de ser produzido em grande escala com custos aceitáveis (comercialização).^{4,21,26}

Por fim, a Figura 7 resume as características mencionadas, para a síntese e fabricação de *scaffolds*.

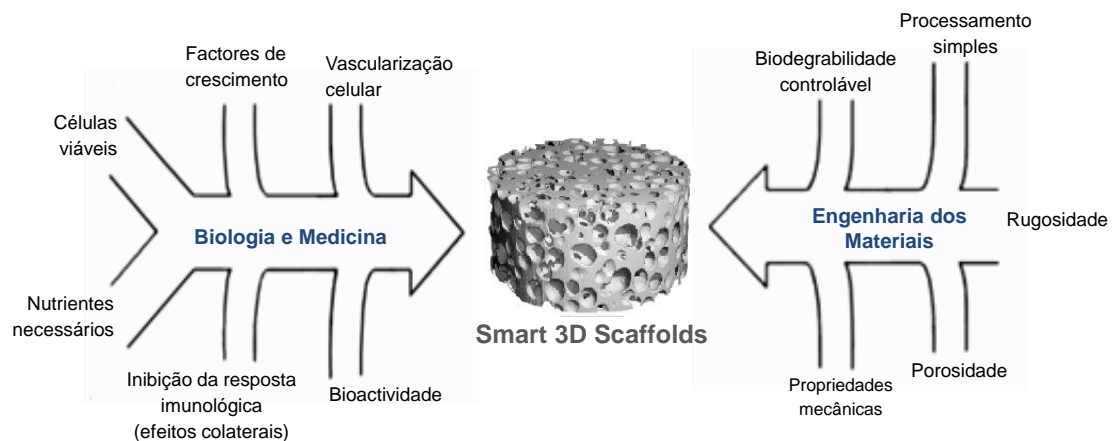


Figura 7: Esquema dos parâmetros essenciais para a produção de scaffolds ideias aplicáveis na engenharia do tecido ósseo (adaptado de [17,19]).

2.3. Biomateriais e Engenharia de Tecido Ósseo

A interacção do biomaterial com os tecidos circundantes é essencial, para se proceder à escolha do material a utilizar no implante.⁴ Os biomateriais podem ser divididos segundo a sua interacção com o meio envolvente. Este conceito foi evoluindo ao longo do tempo, sendo a classificação ordenada através de distintos tipos de gerações, nomeadamente 1^a, 2^a e 3^a geração.^{8,30}

A 1^a geração de biomateriais é referente aos materiais bioinertes, ou seja, não existe interacção entre o material e os tecidos. A crescente necessidade de produzir biomateriais que interagissem com os tecidos adjacentes, isto é, que apresentassem características como a bioactividade e a biodegradabilidade, levou ao desenvolvimento

da 2ª geração. As características mencionadas permitem a formação de um vínculo entre o material e o tecido adjacente. Deste modo, o processo de regeneração ocorre simultaneamente à reabsorção do material pelo organismo. Os últimos progressos têm sido no sentido de desenvolver biomateriais de 3ª geração, através de técnicas de engenharia de tecidos. Os biomateriais são desenhados e sintetizados, com o intuito de estimular respostas celulares específicas, levando a um aumento da eficácia da regeneração celular.^{8,30}

Os materiais usados para a produção de *scaffolds* podem ter origem natural ou sintética. Entre os materiais naturais, estão incluídas proteínas, sacarídeos e materiais inorgânicos modificados. Estes materiais apresentam excelentes índices de compatibilidade mecânica e estrutural com os tecidos a regenerar, porém existe um interesse crescente no desenvolvimento de materiais sintéticos, já que estes podem ser produzidos de uma forma mais controlada (microestrutura) e em larga escala. Os principais materiais sintéticos são os materiais orgânicos ou polímeros e os materiais inorgânicos, como os cerâmicos, os vidros ou os vitrocerâmicos.⁸

Os materiais cerâmicos são utilizados numa vasta gama de aplicações biomédicas, sendo designados por biocerâmicos. Entre os biocerâmicos mais utilizados destacam-se a alumina (Al_2O_3), a zircónia (ZrO_2) e os fosfatos de cálcio (CaPs, do inglês *calcium phosphates*).³¹

Os fosfatos de cálcio representam uma das alternativas mais promissoras no campo da medicina regenerativa como, por exemplo, no preenchimento de defeitos ósseos, nos revestimentos de implantes, como transportadores de fármacos e genes. Adicionalmente, estudos recentes demonstram que as partículas de fosfatos de cálcio inibem o crescimento de vários tipos de células cancerígenas.³² Além disto, estes materiais podem ser sintetizados e aplicados nas mais diversas formas, como por exemplo, pós, grânulos ou cimentos ósseos, dependendo do tecido a regenerar.⁵

A parte inorgânica do tecido ósseo é composta, maioritariamente, por fosfatos de cálcio, o que explica o facto de estes materiais apresentarem propriedades mais adequadas (biocompatibilidade, bioactividade e osteocondutividade), para fins de remodelação e/ou regeneração óssea. A capacidade de serem produzidos em grande escala com preços baixos e a sua estabilidade, também são vantagens que tornam estes materiais bastante investigados. No entanto, apresentam inconvenientes como a

fragilidade e a reduzida elasticidade, o que determina baixa estabilidade mecânica, podendo comprometer a sua utilização na regeneração de grandes defeitos ósseos.^{5,33}

O presente trabalho foca-se no desenvolvimento de grânulos porosos multifuncionais de fosfato de cálcio, constituídos por HA e o β -TCP pelo que se torna relevante fazer uma reflexão sobre as suas características e propriedades.

2.3.1. Materiais Cerâmicos - Fosfatos de Cálcio

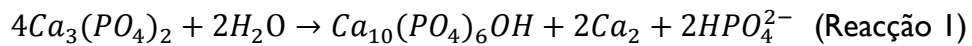
Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos bioativos, sendo classificados de acordo com a razão molar de cálcio/fósforo (Ca/P), que pode variar entre 0,5 e 2.^{5,34} A Tabela 2 apresenta as diferentes fases dos fosfatos de cálcio mais utilizados em aplicações biomédicas assim como as suas características.

Tabela 2: Principais compostos de fosfatos de cálcio e as suas características (nome, abreviatura, fórmula química e razão molar Ca/P) (adaptado de [5]).

Composto	Abreviatura (termos em inglês)	Fórmula	Razão Ca/P
Fosfato monocalcico monidratado (Monocalcium phosphate monohydrate)	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Fosfato monocalcico anidro (Monocalcium phosphate anhydrous)	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5
Fosfato dicalcico diidratado ou brushite (Dicalcium phosphate dihydrate or brushite)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1
Fosfato dicalcico anidro ou monetite (Dicalcium phosphate anhydrous or monetite)	DCPA	CaHPO_4	1
Fosfato octacalcico (Octacalcium phosphate)	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato de cálcio amorfo (Amorphous calcium phosphate)	ACP	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ $n=3 - 4,5$	1,2-2,2
Alfa-fosfato tricalcico (Alpha-tricalcium phosphate)	α -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Beta-fosfato tricalcico (Beta-tricalcium phosphate)	β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hidroxiapatite deficiente em cálcio (Calcium deficient hydroxyapatite)	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ $0 < x \leq 1$	1,5-1,67
Hidroxiapatite (Hydroxyapatite)	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato tetracalcico (Tetracalcium phosphate)	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2

Existem duas categorias diferentes de fosfatos de cálcio. Os fosfatos de cálcio de baixa temperatura, produzidos por precipitação a partir de soluções aquosas e/ou próximo da temperatura ambiente; e os fosfatos de cálcio de alta temperatura, sendo estes obtidos por reacções a temperaturas elevadas. A maior parte dos produtos de fosfatos de cálcio existentes no mercado pertencem a esta segunda categoria.³⁵

A estabilidade das fases do material está intimamente relacionada com a presença de água na etapa de processamento e no meio onde este é aplicado. Entre todos os fosfatos de cálcio apresentados na Tabela 2, apenas duas formas são estáveis em contacto com o meio fisiológico e à temperatura do corpo humano (37°C): o fosfato dicálcico dihidratado (se o pH do meio fisiológico for menor que 4,2) e a hidroxiapatite (se o pH do meio fisiológico maior que 4,2). A temperaturas mais elevadas podem formar-se o β -fosfato tricálcico, o α -fosfato tricálcico, e o fosfato tetracálcico, dependendo da razão Ca/P e das condições de tratamento térmico. Estes fosfatos de cálcio de elevadas temperaturas, ao interagirem com a água ou fluidos corporais, degradam-se e formam hidroxiapatite carbonatada, na interface fluido/material. Esta reacção pode ser acelerada com o aumento da porosidade do material (Reacção 1).^{35,36}



Estudos anteriores demonstram que a solubilidade da componente inorgânica do osso está relacionada com a concentração de iões que integram o fluido extracelular, como, por exemplo, o Ca^{2+} , o PO_4^{3-} e o CO_3^{2-} .⁵ Além disso, os osteoblastos, durante o processo de reabsorção, produzem grandes quantidades de ácido e, conseqüentemente induzem a dissolução do osso.³⁷ Sendo assim, é importante analisar a Figura 8 referente ao diagrama das isotérmicas de solubilidade de diferentes fosfatos de cálcio em solução aquosa.

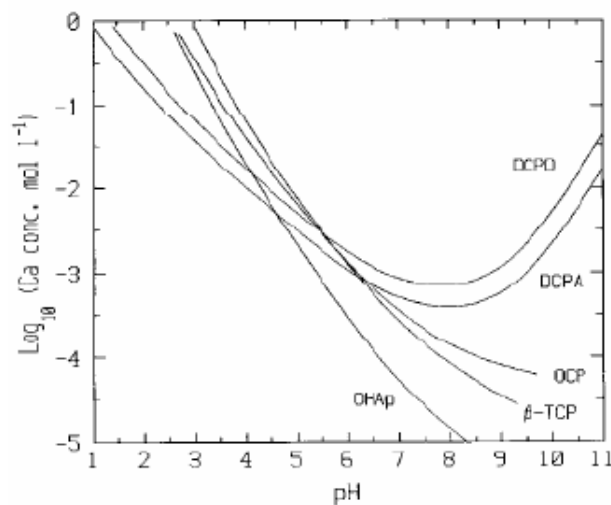


Figura 8: Diagrama de isotérmicas de solubilidade dos diferentes fosfatos de cálcio em água. A solubilidade é expressa pela quantidade total de iões cálcio na solução (adaptado de [37]).

A degradação e a reabsorção dos fosfatos de cálcio são causadas pela dissolução físico-química, desintegração física e factores biológicos. Quanto à dissolução físico-química, esta depende da solubilidade do material e do pH do meio, podendo ocorrer a formação de novas fases. Na desintegração física, há a formação de partículas pequenas, devido ao ataque químico preferencial às fronteiras de grão. Relativamente aos factores biológicos, como por exemplo a fagocitose, resultam numa redução no valor de pH e, por consequência, induzem a degradação dos fosfatos de cálcio.³⁶ Os fosfatos de cálcio degradam-se *in vivo* segundo a ordem indicada da Tabela 3.

Tabela 3: Ordem segundo a qual os compostos de fosfatos de cálcio se degradam em *in vivo* (adaptado de [34]).

Ordem de degradação (do mais solúvel para o menos)	Composto	Abreviatura (termos em inglês)
1º	Fosfato dicálcico anidro ou monetite (<i>Dicalcium phosphate anhydrous or monetite</i>)	DCPA
2º	Fosfato dicálcico diidratado ou brushite (<i>Dicalcium phosphate dihydrate or brushite</i>)	DCPD
3º	Fosfato octacálcico (<i>Octacalcium phosphate</i>)	OCP
4º	Fosfato tricálcico (<i>Tricalcium phosphate</i>)	TCP
5º	Hidroxiapatite (<i>Hydroxyapatite</i>)	HA

A HA e o β -TCP destacam-se entre os vários tipos de fosfatos de cálcio, devido às suas propriedades em ambiente fisiológico, que estimulam a proliferação celular e induzem a regeneração dos tecidos lesados. Pela observação da Figura 8 e Tabela 3, a HA e o β -TCP são os fosfatos de cálcio menos solúveis, devido à elevada cristalinidade. O grau de degradação dos biomateriais aumenta com o aumento da área superficial (pós > sólido poroso > sólido denso), com a diminuição da cristalinidade e com o baixo tamanho de grão.^{36,38}

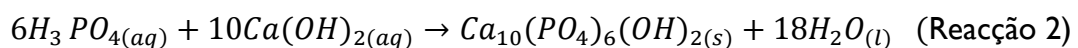
Estudos realizados *in vivo* revelam, que a hidroxiapatite só é reabsorvida pelo organismo decorridos 4 ou 5 anos após a colocação do implante, enquanto o β -TCP é bioreabsorvível ao fim de 1 a 2 anos após sua colocação. A velocidade de reabsorção é uma característica fulcral, para o uso destes biomateriais, dado que o processo de degradação do implante é concomitante com a formação do novo tecido.^{4,22}

2.3.1.1. Hidroxiapatite

A HA [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], é o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel. A sua semelhança com a matriz inorgânica dos ossos faz com que seja um dos biomateriais mais biocompatíveis e um dos fosfatos de cálcio mais atractivos para a medicina regenerativa.³³ A HA apresenta características como a osteocondução e a osteointegração e ainda possui uma taxa de degradação lenta, que assegura a forma geométrica dos *scaffolds* durante o processo de regeneração do tecido ósseo. No entanto, a hidroxiapatite possui como limitação uma resistência mecânica inferior ao tecido ósseo, sendo necessário combiná-la com outros biomateriais que lhe confirmam melhores propriedades mecânicas.^{33,39}

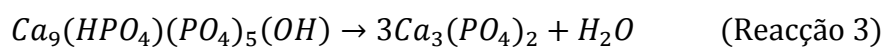
A HA possui a particularidade de poder ser obtida por diferentes processos, seja por via húmida (precipitação, hidrólise) ou por reacções estado-sólido (mecano-síntese).^{33,40}

No presente trabalho, recorreu-se ao processo por via húmida para a obtenção de pós de fosfato de cálcio, que se encontra descrito no Capítulo 3. Por este método, a obtenção de HA pode ser conseguida utilizando como reagentes o ácido fosfórico [H_3PO_4] e hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$], usando uma razão molar Ca/P de 1,67 a $\text{pH} > 9$ e a temperaturas de calcinação acima de 1000°C , de acordo com a Reacção 2 seguinte.^{2,40,41}



2.3.1.2. β -Fosfato Tricálcico

O β -TCP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] é originado quando o razão molar Ca/P é cerca de 1,5. O método mais comum para a obtenção de fosfato tricálcico é por precipitação por via húmida, que resulta na formação de uma apatite deficiente em Ca (ou apatite não-estequiométrica). Após um tratamento térmico (calcinação) com temperaturas que variam entre os 700°C e os 800°C , a apatite deficiente em Ca transforma-se num polimorfo de baixa temperatura, denominado por β -TCP. Essa reacção é caracterizada pela perda de água, como se pode observar na Reacção 3.⁴²



De acordo com a estabilidade térmica/temperatura de tratamento térmico, podem existir três polimorfos de fosfatos tricálcico, nomeadamente, o β -TCP, o alfa-fosfato

tricálcico (α -TCP, do inglês *alpha-tricalcium phosphate*) e o α' -TCP. A forma α' -TCP apenas existe a temperaturas superiores a 1430°C e reverte quase instantaneamente em α -TCP, por arrefecimento abaixo da temperatura de transição. A fase β é estável a baixas temperaturas e transforma-se em α a partir dos cerca de 1125°C. Apesar de terem a mesma composição química, as fases diferem consideravelmente na sua estrutura, densidade e solubilidade que, por sua vez, determinam as suas propriedades biológicas e as aplicações clínicas. Comparativamente, o α -TCP é mais solúvel e mais biodegradável do que o β -TCP.^{43,44}

O β -TCP tem sido amplamente usado para aplicações biomédicas, devido à sua rápida taxa de reabsorção (em comparação à HA), levando à diminuição dos tempos de adaptação e de reabilitação do doente.^{43,44} Porém, algumas limitações deste material prendem-se com a sua falta de suporte estrutural, causada pela sua reabsorção demasiada rápida, sendo oportuno combiná-lo com outros elementos que lhe confirmam melhores propriedades.^{45,46}

2.3.1.3. Fosfatos de Cálcio Bifásicos

Para além das características interessantes que a hidroxiapatite (biocompatibilidade) e o beta-fosfato tricálcico (biodegradabilidade) apresentam separadamente, diversos estudos apontam que a combinação dos dois biomateriais resulta num composto bifásico de fosfato de cálcio (BCP, do inglês *biphasic calcium phosphate*) com propriedades melhoradas, comparativamente aos seus componentes individuais (HA e β -TCP).^{2,8}

Os fosfatos de cálcio bifásicos apresentam um elevado potencial e versatilidade para materiais de substituição óssea e para sistemas de entrega controlada de fármacos, devido à combinação das suas características, nomeadamente, a similaridade com a componente inorgânica do osso, excelentes índices de biocompatibilidade, de osteocondução, e de osteointegração e o seu comportamento de dissolução. A taxa de dissolução da HA e do β -TCP é diferente, pois a primeira é mais estável e apresenta uma taxa de reabsorção lenta, enquanto o último possui uma taxa de degradação mais rápida.^{2,3} Assim, deve ser conseguido um equilíbrio ideal entre a fase mais estável da HA e a mais solúvel do β -TCP, com o intuito de se obter uma dissolução gradual e controlada do *scaffold*, que induz a formação do novo osso com a libertação de iões de cálcio (Ca^{2+}) e de fosfato (PO_4^{3-}) no meio biológico.⁸

Segundo Kumar *et al.*, (2015) as misturas bifásica (HA, Ca/P=1,67 e β -TCP, Ca/P=1,50) podem ser formadas tanto por via húmida como por reacções do estado-sólido, usando uma razão molar Ca/P <1,67 com pH de cerca de 9 e temperatura de calcinação a 800°C. Contudo, os distintos parâmetros aplicados no processo de síntese de fosfatos de cálcio bifásicos, resultam na formação de misturas bifásicas com diferentes propriedades, uma vez que a razão molar pode ser manipulada, de modo a produzir um compósito mais ou menos solúvel.^{2,45}

Os fosfatos de cálcio bifásicos com razões variáveis de HA/ β -TCP estão disponíveis comercialmente em diversas empresas, como por exemplo, Biosel[®] (Depuy Bioland, França), GenPhos HA TCP[®] (Baumer, Brasil), ReproBone[®] (Ceramisis, Reino Unido), 4Bone[®] (MIS, Israel), Ceratite[®] (NGK Spark Plug, Japão) e entre outras.³⁵

2.3.1.4. Agentes Dopantes

Um dos mais recentes interesses da comunidade científica passa pela dopagem dos fosfatos de cálcio com oligoelementos, que são elementos químicos essenciais, geralmente encontrados em baixa concentração no organismo e também presentes na composição óssea. Estes desempenham um papel importante nos processos biológicos, já que promovem os mecanismos de regeneração óssea após-implantação.⁴⁷ A dopagem consiste na substituição iónica da estrutura molecular dos fosfatos de cálcio, podendo ocorrer de forma catiónica (substituição de cálcio) ou aniónica (substituição do fosfato).⁴⁴

O manganês (Mn) é um elemento essencial no metabolismo ósseo que controla a actividade celular dos osteoblastos e dos osteoclastos durante a remodelação de tecidos.⁴⁸ A presença de Mn aumenta a afinidade de ligação das integrinas, que são proteínas que medeiam as interacções entre as células e a matriz extracelular e, por consequência, promovem a adesão celular.⁴⁷ Assim, a dopagem de fosfatos de cálcio com este elemento pode melhorar a sua *performance* em termos de biocompatibilidade, de bioactividade e de aceleração da mineralização óssea.^{47,48} Porém, uma exposição prolongada a grandes concentrações de Mn pode originar manganismo, uma doença neuro-degenerativa semelhante à doença de Parkinson, que causa distúrbios psiquiátricos e motores.^{47,49} Torres *et al.* (2014) demonstraram que a dopagem de β -TCP com uma pequena concentração de manganês (entre 0,5 a 1%) é

eficaz na aceleração da mineralização óssea e contribui positivamente para a proliferação e diferenciação de osteoblastos.⁴⁷

O estrôncio (Sr) é outro oligoelemento cada vez mais investigado. Este é habitualmente referido na literatura anglo-saxónica um *bone-seeking element*, uma vez que se acumula no osso, comportam-se quimicamente como o cálcio e pode inclusivamente substituí-lo na composição óssea. Este elemento químico apresenta um comportamento dual, uma vez que pode aumentar a capacidade de formação de novo osso e pode reduzir a absorção óssea.⁵⁰⁻⁵² Segundo Xie *et al.*, (2013) os fosfatos de cálcio dopados com Sr demonstraram ser potenciais candidatos, para acelerar os processos de osteogénese e de angiogénese no tratamento de defeitos ósseos.⁵¹

O zinco (Zn) é um oligoelemento que está presente em todos os tecidos humanos e os ossos contêm 30% do Zn total do corpo.⁵³ O papel do zinco nos processos de regeneração óssea tem sido bastante estudado e verifica-se que é determinante para a optimização das actividades osteoblástica e enzimática, para o metabolismo de ácidos nucleicos e para a síntese proteica.⁵⁴ Este elemento tem um efeito directo na proliferação das células osteoblásticas, bem como um efeito inibitório nos osteoclastos durante o processo de reabsorção.^{44,52}

A dopagem dos fosfatos de cálcio com o Mn, o Sr e o Zn para aplicações na medicina regenerativa tem demonstrado que melhoram a resistência mecânica, permitem uma degradação controlada dos *scaffolds* e influenciam positivamente a resposta biológica.⁵²

2.3.1.5. Grânulos Porosos de Fosfatos de Cálcio

Os biomateriais granulados envolvem processos físicos, químicos e mecânicos que levam à formação de partículas com dimensões, formas, estruturas e propriedades físicas controladas. Os grânulos de fosfato de cálcio têm ganho um crescente interesse na comunidade científica, devido à sua capacidade de preenchimento dos defeitos ósseos irregulares (capacidade de rearranjo espacial) e à sua taxa de absorção mais rápida, do que materiais densos. Estudos realizados demonstram que grânulos com uma distribuição homogénea de poros permitem aumentar a eficácia da taxa de regeneração do tecido ósseo, sendo potenciais veículos para o preenchimento de defeitos ósseos e reconstrução óssea, e para a entrega de agentes químicos e/ou biológicos.^{5,6,55}

Existem diversos métodos para a preparação de grânulos porosos de fosfatos de cálcio como, por exemplo, a secagem por atomização (do inglês *spray-drying*) e a gelificação ionotrópica.^{6,55,56} Este último método consiste na gelificação do alginato de sódio na presença de íons de Ca^{2+} , que origina grânulos com um diâmetro uniforme. Para tal, é necessário preparar uma suspensão de fosfatos de cálcio, que será misturada com alginato de sódio. Posteriormente, a suspensão é gotejada para uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2), de modo a obter os grânulos esféricos, conforme a Figura 9.⁵⁵

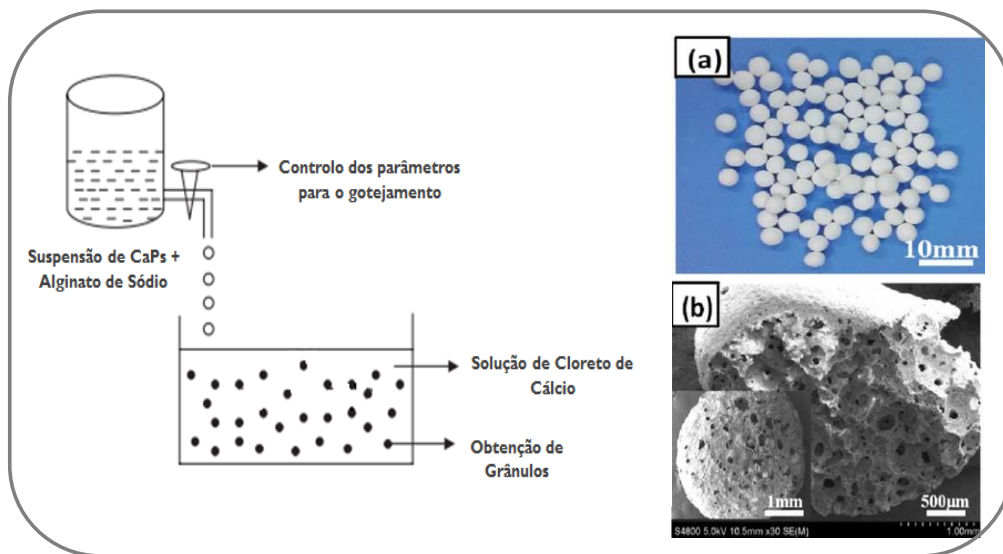


Figura 9: Esquemática do método de gelificação ionotrópica; morfologia (a) e microestrutura (b) dos grânulos de fosfatos de cálcio obtidos (adaptado de [55,57]).

Atualmente existem no mercado diversos grânulos porosos de fosfatos de cálcio, constituídos por HA, por β -TCP ou por misturas bifásicas. Tome-se como, por exemplo, o *Ceros[®]TCP* (Thommen Medical, Suíça) que são grânulos constituídos por β -TCP e apresentam micro e macro poros interligados, demoram 6 a 18 meses para se degradarem totalmente e formarem novo tecido. O *Adbone[®]TCP* (Medbone, Portugal), que são grânulos porosos constituídos por β -TCP e devido às suas propriedades como, a elevada bioactividade, estimulam a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, permitindo a substituição total por novo tecido ósseo, num período de cerca de um a seis meses. O *Ceraform[®]* (Teknimed, França) são grânulos bifásicos formados por 65% de HA e 35% de β -TCP, apresentando micro e macro poros interligados. Estudos realizados em ratos demonstram que estes grânulos demoram 18 semanas a formar novo tecido ósseo, devido ao seu elevado índice de osteocondução. E por fim, o

Neobone[®] (Ceramed, Portugal) são grânulos bifásicos constituídos por 75% de HA e 25% de β -TCP com micro e macro poros interligados, que permitem a regeneração de novo osso.

2.4. Libertação Controlada de Fármacos

O presente trabalho tem como objectivo o desenvolvimento de grânulos porosos multifuncionais, com capacidade de regeneração e entrega de fármaco (doxorrubicina) *in situ*, para aplicações oncológicas (osteossarcoma). Para tal, fundamental fazer um enquadramento da doença e do fármaco em estudo.

2.4.1. Scaffolds para a Libertação Controlada de Fármacos

Muitas doenças ósseas são de natureza sistémica, porém a sua patologia é frequentemente expressa em sítios localizados. O cancro é a segunda causa mais frequente de morte no mundo, apesar dos progressos nos métodos de prevenção, diagnóstico e terapia.³⁹ A predominância do cancro é crescente e, segundo a *Agência Internacional de Investigação do Cancro*, espera-se que em 2030 cerca de 21 milhões de novos casos de cancro sejam diagnosticados.⁵⁸

Para o tratamento de cancros é usual recorrer a métodos como, por exemplo, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. A administração de fármacos anticancerígenos por via oral e intravenosa nos tratamentos convencionais pode causar efeitos colaterais e toxicidade geral, já que os agentes químicos se acumulam nas células normais e tumorais devido à falta de especificidade.⁵⁹

A crescente incidência de cancros torna imperativo o desenvolvimento de novas abordagens. Os actuais desafios da investigação em terapias anticancerígenas passam por reduzir a toxicidade sistémica e melhorar a qualidade de vida do doente. Para tal é necessário o desenvolvimento de novos fármacos contra as células tumorais e a melhoria da sua actividade, através da entrega específica no local, com redução da toxicidade sistémica.^{39,59}

Os materiais à base de apatites e os seus derivados têm sido recentemente investigados, com o intuito de se produzirem sistemas com capacidade de entrega de fármacos *in situ* com o mínimo de toxicidade. No caso dos tumores dos ossos, em especial o osteossarcoma, após excisão do tumor, o tecido perdido pode ser

preenchido com os materiais previamente impregnados com fármacos anticancerígenos. Assim irá ocorrer uma liberação controlada dos fármacos *in situ*, simultânea com o processo de regeneração óssea, como se pode constatar na Figura 10.³⁹

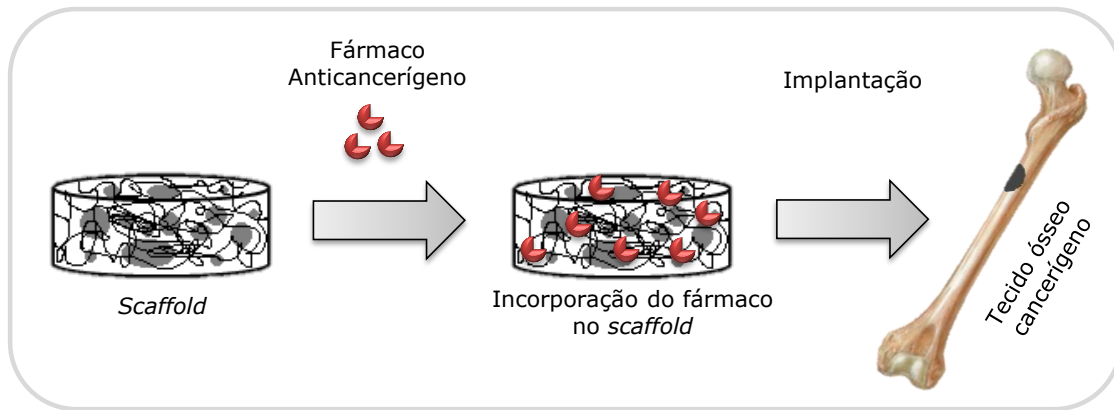


Figura 10: Ilustração esquemática da entrega terapêutica *in situ* (adaptado de [39]).

Para se desenvolver um sistema de liberação controlada de fármacos é necessário ter em conta alguns aspectos, tais como, o perfil de liberação do fármaco, adequada estabilidade do fármaco no sistema libertador, a microestrutura (porosidade) do material que deve oferecer previsibilidade quanto às taxas de liberação e de degradação *in vivo*. Existem diversos factores que podem influenciar a adsorção de fármaco ao material como, por exemplo, o pH, a temperatura, o tipo de adsorvente e o estado da superfície do material.^{9,60}

2.4.2. Osteossarcoma

O osteossarcoma (OS) é o tumor ósseo maligno primário e o segundo tipo de cancro mais comum em crianças e adolescentes.^{61,62} Todavia, é considerado uma neoplasia relativamente rara, com uma incidência global de 0,2–3/100 000 casos por ano, que representa 0,2% de todos os tumores malignos. Cerca de 75% dos doentes com osteossarcoma têm idades entre os 15 e os 25 anos.^{63,64} Este tumor afecta maioritariamente indivíduos do género masculino, numa proporção de 1,6:1. No entanto, manifesta-se mais cedo nos indivíduos do género feminino, uma vez que durante a puberdade o surto de crescimento é mais precoce.^{61,65} Este cancro apresenta-se em diferentes idades, isto é, o primeiro pico de incidência ocorre entre os 10 e os 14 anos e o segundo pico aparece em idades acima dos 65 anos.^{61,66,67} Neste

último caso, o aparecimento da doença está frequentemente relacionada com a doença de Paget do osso. Esta doença é caracterizada por acelerar o processo de remodelação óssea, que origina áreas de excessiva reabsorção e áreas de abundante formação de novo osso.^{64,68}

O osteossarcoma pode desenvolver-se em qualquer tipo de osso, porém cerca de 80% a 90% dos casos ocorrem mais frequente na metáfise dos ossos longos, nomeadamente no fémur distal (40%), na tíbia proximal (20%), e no úmero proximal (10%). O osteossarcoma tem origem na cavidade medular, invadindo posteriormente o córtex (zona mais periférica do osso) provocando a destruição cortical com envolvimento dos tecidos moles adjacentes, como os músculos, os tendões e os vasos sanguíneos, como demonstrado na Figura 11.^{61,63,64,69}

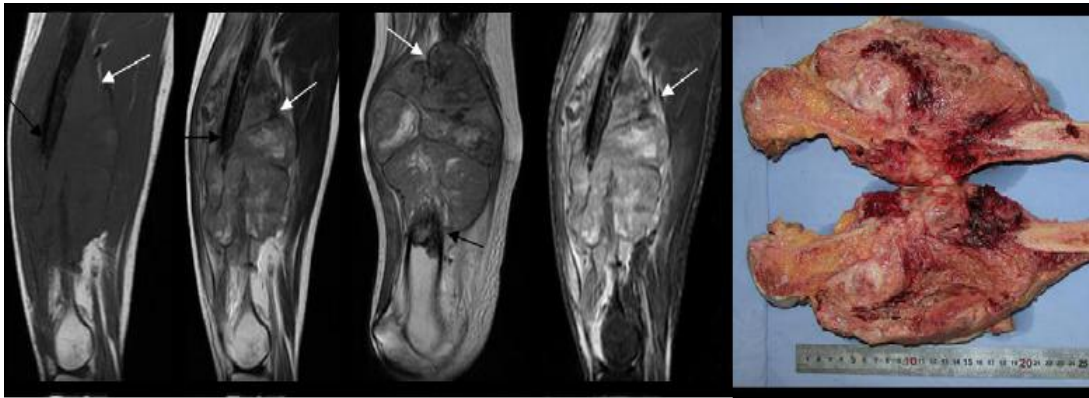


Figura 11: Imagem representativa de um osteossarcoma na diáfise do fémur de um jovem de 17 anos. As radiografias demonstram uma alta densidade no interior da cavidade medular (massa de tecido mole em redor do osso) e a consequente destruição óssea, resultando na fractura patológica (adaptado de [69]).

A origem do osteossarcoma não se encontra totalmente esclarecida, no entanto existem evidências que este tumor é o resultado de mutações genéticas nas células estaminais mesenquimatosas (MSCs), durante o processo de diferenciação dos osteoblastos. As MSCs são células indiferenciadas multipotentes de origem não hematopoiética e com elevada capacidade de auto-renovação.⁷⁰ Estas células foram primeiramente identificadas na medula óssea, embora existam também no sangue do cordão umbilical e em diversos tecidos do corpo humano, sendo precursoras de diferentes linhagens, como por exemplo as células do tecido ósseo (osteócitos), do tecido adiposo (adipócitos) e da cartilagem (condroblastos), como se pode observar na Figura 12.⁷¹⁻⁷³

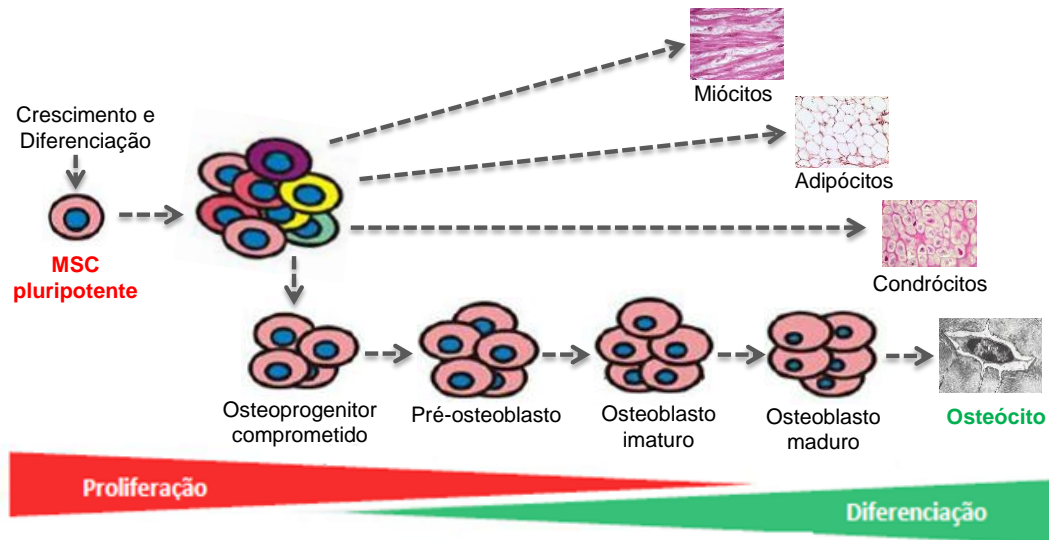


Figura 12: Diferenciação das MSCs em múltiplas linhagens, tais como miócitos, adipócitos, condrocitos e osteócitos (adaptado de [71]).

As células de osteossarcoma apresentam algumas semelhanças com os osteoblastos, uma vez que produzem uma matriz osteóide, sendo esta a base para o diagnóstico histológico, que permite distinguir o OS de outros tumores ósseos. Como o OS exibe uma diversidade de padrões histológicos, a sua classificação é feita com base no tipo e na quantidade de matriz extracelular produzida e no tipo e nas características das células (como, por exemplo, os osteoblastos pouco diferenciados).⁶³ Quanto maior for o estado de indiferenciação das células em que as mutações ocorrem, mais indiferenciado e agressivo será o tumor resultante.^{66,71}

2.4.3. Tratamento do Osteossarcoma - Doxorrubicina

Antes da década de 70, o prognóstico dos doentes com osteossarcoma era devastador, uma vez que a taxa de sobrevida aos 5 anos, ou seja, a percentagem de pacientes que vivem pelo menos 5 anos após o diagnóstico da doença, correspondia apenas a 10–20%. Nos últimos anos, com a introdução da quimioterapia sistémica pré-operatória (neo-adjuvante) e pós-operatória (adjuvante) e com os avanços nas técnicas cirúrgicas e nas técnicas de diagnóstico por imagem, a taxa de sobrevida aos 5 anos aumentou consideravelmente para cerca de 65–75% para os doentes sem evidências clínicas de doença metastática na altura do diagnóstico.^{64,74,75}

A quimioterapia neo-adjuvante induz a necrose no tumor primário, facilitando a sua excisão cirúrgica e a eliminação de possíveis metástases.^{63,75} Na Figura 13 é possível verificar as diferenças entre as células tumorais antes e depois da quimioterapia.

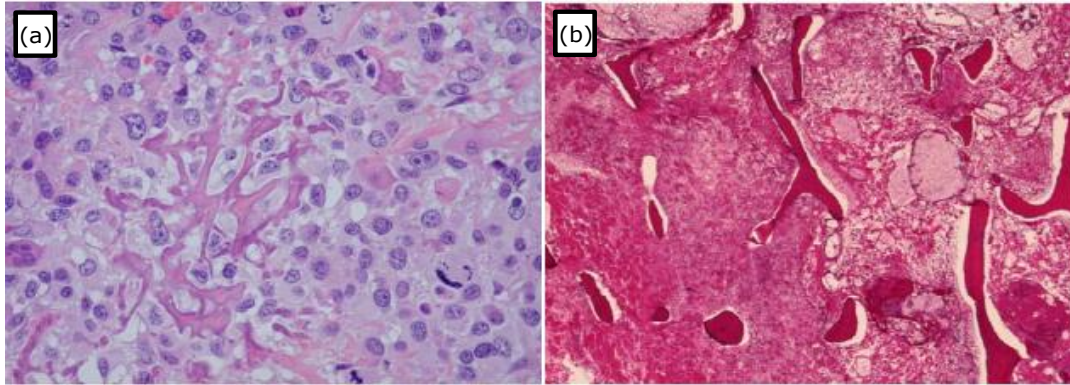


Figura 13: Histologia do osteossarcoma antes (a) e depois (b) da quimioterapia pré-operatória (boa resposta) (adaptado de [75]).

A excisão cirúrgica continua a ser essencial para a cura, visando a preservação dos tecidos não envolvidos. Os avanços das técnicas de imagem e os efeitos positivos da quimioterapia neo-adjuvante levaram a uma diminuição das amputações, no entanto cerca de 20% dos doentes ainda são amputados.⁶³ Os pacientes que apresentem uma percentagem de necrose superior a 90%, exibindo uma boa resposta histopatológica à quimioterapia pré-operatória, têm à partida um bom prognóstico, com uma taxa de sobrevida aos 5 anos superior a 65–75%. Os doentes com uma resposta histológica de necrose tumoral inferior a 90%, apresentam uma taxa de sobrevida inferior a 15%.^{61,74}

Segundo o *European and American Osteosarcoma Study Group* (EURAMOS-1), actualmente os protocolos de quimioterapia baseiam-se na administração de doxorrubicina (DOX), cisplatina (CIS), altas concentrações de metotrexato (MTX) e ifosfamida.^{75,76}

A doxorrubicina é um importante fármaco anticancerígeno, já que possui um largo espectro, sendo utilizado em várias neoplasias, por exemplo, nos sarcomas dos tecidos moles e nos sarcomas osteogénicos, em mielomas múltiplos, nos carcinomas da tiróide, da mama, do ovário e da bexiga. Este fármaco pertence à classe das antraciclina e é normalmente utilizado em conjunto com outros fármacos. A sua fórmula química, $C_{27}H_{29}NO_{11}$, corresponde a uma massa molar de 543,52 g/mol. O uso clínico da doxorrubicina, bem como de todas as antraciclina, deve ser limitado, uma vez que estão associadas a cardiotoxicidade que pode, eventualmente, provocar

insuficiência cardíaca (apresentando uma taxa de mortalidade de 20–40%), dependente da dose acumulada.⁷⁷

A doxorubicina inibe a acção da topoisomerase II e interfere com a formação do complexo topoisomerase II-ADN, que leva às quebras na dupla cadeia de ADN. Tal facto inibe a duplicação do ADN e a transcrição do mRNA e, por consequência, induz a morte celular. A produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) também pode ser um efeito citotóxico da doxorubicina nas células cancerígenas.⁷⁷⁻⁷⁹ O mecanismo de acção da doxorubicina está ilustrado na Figura 14.

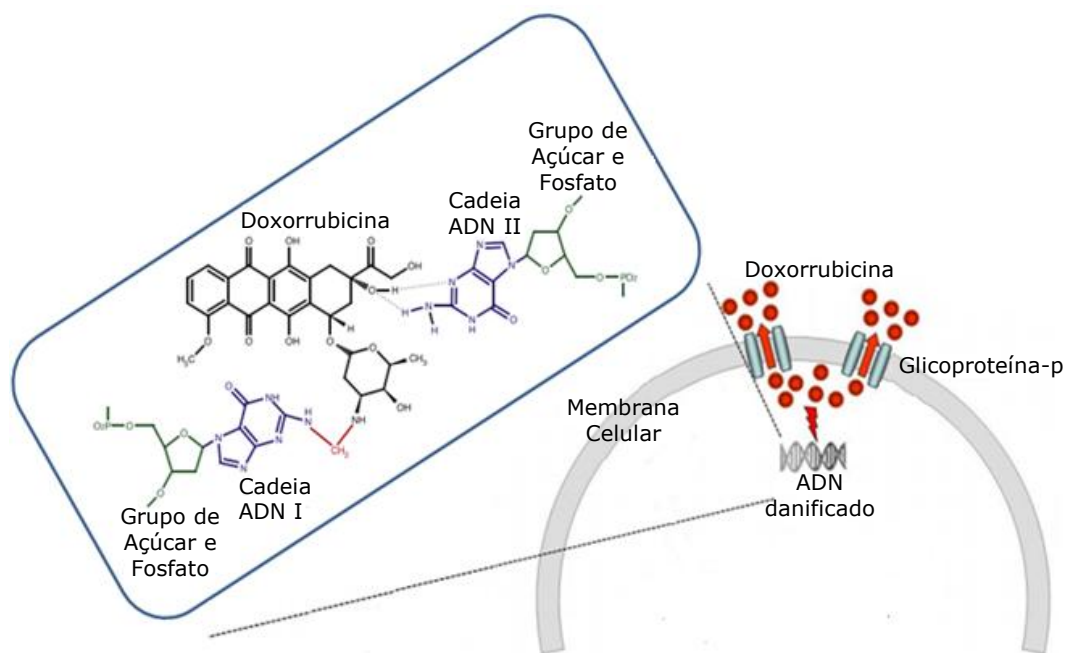


Figura 14: Mecanismo de acção da DOX (adaptado de [78,79]).

Para desenvolver um sistema de libertação de fármacos é importante considerar diversos factores, que podem influenciar a adsorção do fármaco ao material, tais como, o pH, a temperatura ou os grupos funcionais que permitem a ligação do fármaco com o material em estudo. Os fosfatos de cálcio apresentam como grupos funcionais o PO_4^{3-} e o OH^- , que interagem com diferentes grupos terminais da doxorubicina, particularmente com os grupos amina e hidroxilo, como se pode observar na Figura 15. Os grupos $-OH$ e $-C$ nos fosfatos de cálcio formam uma forte ligação de hidrogénio com os grupos $-OH$ e $-NH_2$ da doxorubicina, permitindo a adsorção do fármaco ao material. Relativamente ao pH, este varia nos sítios específicos do organismo, sendo que tecidos cancerígenos ou infectados exibem um pH mais ácido

(pH<6,5) do que um tecido normal (pH≈7,4).^{80,81} Kundu *et al.*, (2013) desenvolveram nanopartículas de HA para a libertação de DOX, estes sistemas foram estudados em condições ácidas, neutras e básicas. Verificou-se que a libertação de DOX e, consequente entrega nas células tumorais, foi mais eficiente em condições ácidas.⁸⁰

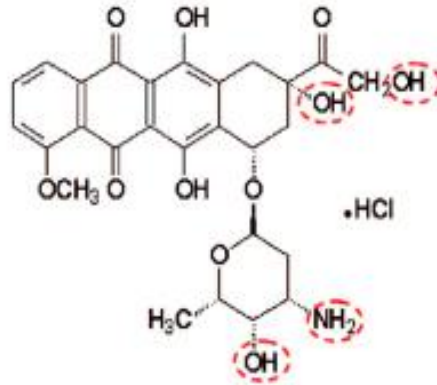


Figura 15: Estrutura molecular da doxorubicina (adaptado de [80]).

2.5. Interações Celulares (*in vitro* e *in vivo*)

A melhor forma de prever o comportamento do material implantado é realizar estudos *in vivo*. No entanto, os custos destes ensaios e a necessidade de utilizar animais continuam a motivar o desenvolvimento de ensaios *in vitro*, usando culturas de osteoblastos. Estes ensaios têm o intuito de compreender a interação dos biomateriais com as células e estudar a sua modulação farmacológica, prevendo assim a performance do material nas condições *in vivo*.⁸

Existem diferentes métodos para realizar testes *in vitro*, um dos exemplos é a medição da capacidade bioactiva do material, pela sua imersão numa solução de plasma humano simulado (SBF, do inglês *simulated body fluid*). Este método foi utilizado no presente trabalho e encontra-se descrito no Capítulo 3. Esta solução possui uma concentração iónica semelhante à do plasma sanguíneo humano, pelo que a imersão de materiais bioactivos provoca a deposição de uma camada de apatite, com composição semelhante à da apatite biológica, na superfície destes.⁴ É de realçar, que a introdução de um *scaffold* no corpo humano provoca a ocorrência de interações entre a superfície do implante e o plasma sanguíneo, que se caracteriza por ser uma solução altamente saturada em iões cálcio e fosfato, mas também contém várias proteínas que

podem, eventualmente, interferir no processo de calcificação. Desse modo, decorrem reacções na interface, que podem conduzir à dissolução do material implantado e à sua reabsorção simultaneamente com a formação de novo tecido. O contacto entre as células e um material bioactivo, como por exemplo a HA e o β -TCP, provoca inicialmente uma deposição de osteoblastos na superfície do material, seguida da formação de uma camada amorfa, constituída principalmente por iões de cálcio e fosfato (camada de apatite). Por consequência, os osteoblastos libertam porções de colagénio que estabelecem uma ligação entre a camada de apatite e as células ósseas. Tal facto permite a precipitação dos cristais da apatite biológica e o posterior desenvolvimento de ligações entre o *scaffold* e o tecido ósseo, induzindo a calcificação.^{7,8}

Outro método de avaliação da potencial adequabilidade dos materiais é através de testes *in vitro* com culturas celulares. Podem usar-se células humanas ou de outros animais (geralmente de origem murina) como, por exemplo, células estaminais mesenquimatosas (MSCs) ou linhas de células derivadas de osteossarcomas, de modo avaliar a diferenciação, a proliferação celular e a citotoxicidade da resposta biológica, quando estas estão em contacto com biomateriais ou com substâncias químicas. Para tal, existe uma série de marcadores como, por exemplo, o colagénio do tipo I, a osteocalcina, a osteonectina, a osteopontina e uma variedade de glicoproteínas da membrana celular. O marcador mais utilizado é a fosfatase alcalina, que é uma enzima que se liga à membrana e é expressa quando existem níveis elevados de diferenciação osteoblástica.^{4,7} O ensaio do MTT é um ensaio colorimétrico muito usado, que determina a actividade metabólica celular e foi o método utilizado no presente trabalho (a sua descrição encontra-se no Capítulo 3).

De modo a tecer considerações sobre as interacções celulares de enxertos ósseos à base de fosfatos de cálcio, apresentam-se de seguida alguns estudos reportados na literatura.

Estudos realizados por Kubo *et al.* (2011) compararam a evolução da regeneração óssea usando enxertos ósseos granulares de hidroxiapatite com formas distintas (esférica e irregular) e com poros interligados, utilizando cães como modelo animal. Neste modelo, foram feitos defeitos ósseos (3 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade) na mandíbula de cada animal. Posteriormente preencheram-se os

defeitos ósseos com a implantação dos grânulos esféricos e dos grânulos irregulares. A avaliação do tecido neo-formado foi realizada histologicamente após 4, 8 e 12 semanas decorridas da implantação, como se verifica na Figura 16. Por fim, verificou-se que a formação de tecido ósseo foi significativamente maior nos implantes de grânulos irregulares do que nos implantes de grânulos esféricos. Assim, para além a interligação de poros, a rugosidade do *scaffold* é um parâmetro a ter em conta, já que pode potenciar a proliferação e a vascularização celular e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade dos implantes efectuados.^{82 83}

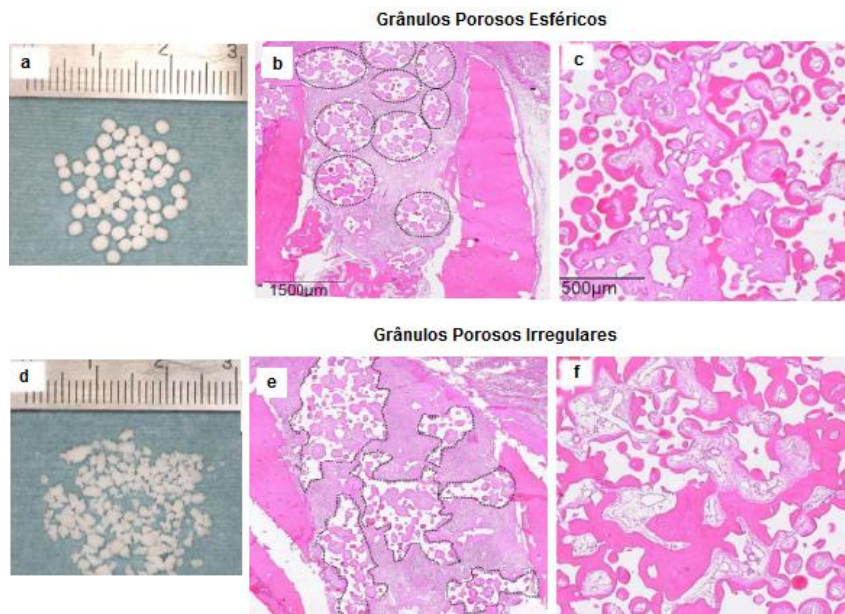


Figura 16: Evolução da regeneração óssea utilizando grânulos porosos esféricos e irregulares; (a) grânulo poroso esférico; (b) corte histológico após 4 semana da implantação; (c) após 12 semana da implantação; (d) grânulo poroso irregular; (e) corte histológico após 4 semana da implantação; (f) após 12 semana da implantação (adaptado de [83]).

Por outro lado, Li *et al.*, (2016) desenvolveram grânulos de HA esféricos, através do método de gelificação ionotrópica, e compararam os resultados obtidos com esses grânulos e com grânulos comerciais irregulares (*BAM® P2040*). Comparativamente aos grânulos irregulares, os esféricos apresentaram uma estrutura mais porosa e interligada, uma maior área superficial e uma capacidade superior de adsorção a proteínas. Assim sendo, este estudo demonstrou que os grânulos esféricos podem ser uma potencial promessa para aplicações ortopédicas, no preenchimento de defeitos ósseos.⁵⁵

Além disso, estudos realizados com HA e com β -TCP, quer na forma de blocos porosos, quer na forma de grânulos têm sido investigados, maioritariamente, com

intuito de avaliar a sua utilização como libertadores de antibióticos como, por exemplo, no caso da osteomielite. Assim, existe pouca informação na literatura sobre os fosfatos de cálcio e DOX em aplicações oncológicas.⁸³

Genin *et al.* (2004) prepararam um sistema de libertação controlada de DOX por grânulos de HA. Após a síntese de pós de HA, seguiu-se a adição de DOX, com uma percentagem em peso de 0,02 wt%, de modo a formar uma pasta. A pasta obtida foi extrudida em moldes cilíndricos e obtiveram-se grânulos com um diâmetro médio de cerca 0,5 mm. Estudos posteriores demonstraram que após 10 horas cerca de 40% do fármaco havia sido libertado de uma forma controlada e eficaz. É de realçar, que a maioria dos tratamentos com fármacos anticancerígenos é limitada pela toxicidade do fármaco.⁸⁴ Kolmas *et al.* (2016) referem alguns exemplos de sistemas à base de HA, para libertação de controlada de DOX. Tome-se como, por exemplo, grânulos de HA com 0,8 mg de DOX, que foram inseridos por via intravenosa na parte central de condrossarcomas, usando ratos como modelo animal. Os resultados obtidos revelaram um óptimo efeito terapêutico, uma vez que a taxa de sobrevivência dos ratos aumentou 90%. Outro exemplo de sistema à base de HA e DOX foi desenvolvido, de modo a perceber a concentração de fármaco a usar, para se atingir um efeito anti-tumoral eficaz. Dessa forma, foram produzidos grânulos de HA impregnados com DOX, que foram inseridos de forma subcutânea em condrossarcomas de ratinhos. A concentração de 6,0 mg/grânulos de HA exibiu uma melhor eficácia terapêutica, já que inibiu o crescimento dos tumores em 98%. A DOX foi libertada continuamente durante 66 dias em estudos *in vitro* e 28 dias *in vivo*, após a implantação nos ratinhos.³⁹

Em suma, da análise de resultados reportados na literatura podemos, de uma forma geral, concluir que a capacidade de regeneração, bem como a quantidade, a velocidade de libertação do fármaco e a especificidade do local onde se pretende a libertação são aspectos fundamentais a ter em consideração no desenvolvimento de potenciais *scaffold*, para fins de preenchimento ósseo e de libertação controlada de fármacos.⁸³

CAPÍTULO 3

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

No presente capítulo são descritos os materiais, equipamentos e metodologias utilizados no procedimento experimental e que incluíram: a preparação e caracterização dos pós de partida, o uso desses pós para o fabrico de grânulos de fosfatos de cálcio e a sua caracterização, a impregnação com doxorrubicina e a avaliação da cinética de libertação do fármaco, bem como da sua citotoxicidade.

3.1. Preparação e Caracterização de Pós e Grânulos de Fosfatos de Cálcio

Primeiramente procedeu-se à preparação e à caracterização de pós e grânulos de fosfatos de cálcio.

3.1.1. Síntese de Pós de Fosfato de Cálcio

As condições de síntese dos diferentes pós de fosfatos de cálcio preparados neste estudo, nomeadamente, o β -TCP puro, o β -TCP co-dopado com Zn, com Sr e com Mn, e o pó bifásico composto por β -TCP e por HA, encontram-se indicadas na Tabela 4. O valor da concentração inicial da solução do precursor fósforo (P) foi mantido fixo em 1,2 M, sendo as dos outros precursores calculadas de modo, que a razão total $(Ca+Sr+Zn+Mn)/P$ se mantivesse constante e igual a 1,5, para o pó de β -TCP puro e dopado. No caso do pó bifásico utilizou-se uma razão molar de $(Ca+Sr+Zn+Mn)/P=1,55$. O número de moles de cada um dos precursores usados na síntese do pó dopado, correspondem a percentagens molares (planeadas) de 0,5% de Mn, 1% de Zn e 5% de Sr.^{47,85-87}

Os pós de fosfato de cálcio foram obtidos, através de precipitação química por via húmida, a partir das soluções dos precursores dissolvidos em água destilada, num reactor a 30°C e sob agitação constante de 700 rpm, durante três horas. O pH das suspensões precipitadas foi mantido a valores aproximadamente constantes, ao longo do processo (verificado de 15 em 15 minutos), usando um medidor de pH (*Consort C1010*). O acerto do pH foi feito através a adição de hidróxido de amónio (NH_4OH , *Sigma-Aldrich*). Os valores de pH foram ligeiramente diferentes consoante o produto final desejado, ou seja, cerca de $pH \approx 7$ na síntese do pó β -TCP puro, cerca de $pH \leq 7$ no

pó β -TCP dopado e cerca de $\text{pH} \approx 7,7$ no caso do pó bifásico.^{47,85,87} O processo de síntese está ilustrado na Figura 17.

Tabela 4: Condições de síntese usadas para a preparação de pó β -TCP puro, pó β -TCP co-dopado e pó bifásico, nomeadamente, as suas respectivas razões molares, precursores, fórmulas químicas, números de moles e fabricante.

		Puro	Dopado	Bifásico
Razão Molar (Ca+Sr+Zn+Mn)/P		1,5	1,5	1,55
Elemento	Precursor	Número de moles (n)		
P	Hidrogenofosfato de Di-amónio [(NH ₄) ₂ HPO ₄]	1,2	1,2	1,2
Ca	Nitrato de Cálcio 4-hidratado [Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	1,8	1,683	1,86
Sr	Nitrato de estrôncio [N ₂ O ₆ Sr]	-	0,09	-
Zn	Nitrato de zinco 6-hidratado [N ₂ O ₆ Zn.6H ₂ O]	-	0,018	-
Mn	Nitrato de Manganês (II) hidratado [MnN ₂ O ₆ .xH ₂ O]	-	0,009	-

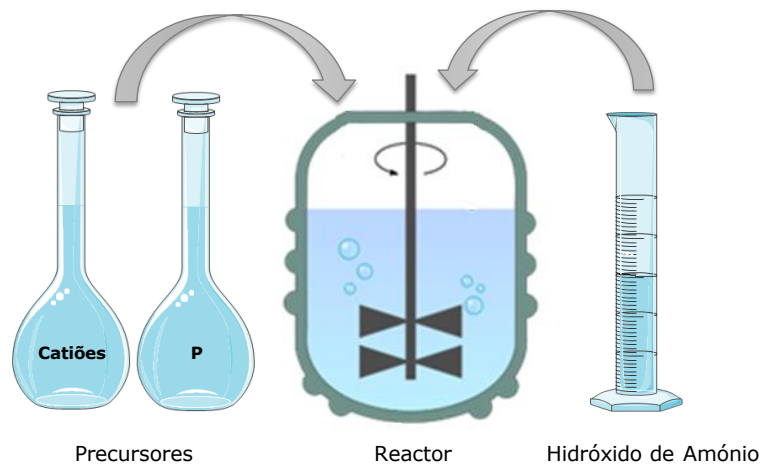


Figura 17: Esquema representativo do processo de síntese de pós. Preparação e adição das soluções dos precursores ao reator, previamente aquecido e sob agitação. Através da adição de hidróxido de amónio, o valor de pH da suspensão foi controlado.

No final das três horas de reacção, os produtos das sínteses foram retirados do reator e passados por um filtro de vácuo, para separar o precipitado da fase líquida. De seguida, foram secos numa estufa (*Venticell*) a 100°C durante três dias e procedeu-se à desaglomeração, para posterior calcinação a 800°C, durante duas horas a

5°C/minuto, no forno *Termolab* com controlador *Eurotherm 2416*. Após a secagem, os pós foram moídos a seco num moinho de bolas, durante 30 minutos, com o intuito de diminuir o tamanho médio de partículas, até aproximadamente 1 μm . Por fim, os pós foram peneirados num equipamento *Retsch AS200*, através de uma rede com malha de abertura de 40 μm , para remover as partículas maiores. Estas etapas estão esquematicamente representadas na Figura 18.



Figura 18: Etapas efectuadas após a síntese de pós. Os produtos das sínteses foram filtrados, secos e desaglomerados, para se proceder à sua calcinação a 800°C. Os pós obtidos foram moídos num moinho de bolas e peneirados, até se atingir o tamanho de partículas desejado.

3.1.2. Caracterização dos Pós

Os pós de fosfatos de cálcio sintetizados foram caracterizados quanto à sua composição de fases cristalinas, distribuição granulométrica e morfologia das partículas.

As fases cristalinas presentes nos pós foram identificadas por difracção de Raios-X (DRX), utilizando um difractómetro de alta resolução, *Rigaku Geigerfle D/Max-SérieC*, equipado com um monocromador curvo de Cu, com uma voltagem de 40 kV e uma corrente de 30 mA, usando a radiação $K\alpha$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$). Para a recolha de dados foram fixados os seguintes parâmetros: 2θ de 10–50°; largura do passo 2θ de 0,02°; tempo por passo de sete segundos. As percentagens de cada uma das fases cristalinas presentes nos pós foram calculadas a partir do software *High Score Plus Xpert-pro PANalytical*, que requer a base de dados do ICDD (*International Center for Diffraction*

Data), usando as fichas PDF (*Powder Diffraction Files*) com a informação cristalográfica, que melhor se ajusta e que quantifica cada fase específica que o espectro de DRX contém. Para tal, utilizou-se a ficha PDF:04-009-3876 para o pirofosfato de cálcio (CPP, do inglês *calcium pyrophosphate*) [$\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$], a ficha PDF:04-006-9376 para o β -TCP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] e a ficha PDF:04-015-7245 para a HA [$\text{Ca}_5(\text{O}_4)_3(\text{OH})$].

As características físicas dos pós foram determinadas pela análise da distribuição granulométrica dos pós, utilizando o *Coulter Particle Size Analyzer* (*Coulter LS230*, Inglaterra), com um modelo óptico *Fraunhofer*.

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia electrónica de varrimento (SEM, do inglês *scanning electronic microscopy*), num microscópio *HITACHI*, modelo *S-4100*, provido de um sistema de emissão de electrões com um filamento de tungsténio, com aceleração de 10 kV e resolução máxima de 15 Å. Para o efeito, foram preparadas suspensões de cada composição, usando como agente desfloculante, o polifosfato de sódio (NaPO_3 , *Sigma-Aldrich*). Colocou-se uma gota de suspensão sobre uma lamela, fixada num suporte de alumínio, com o auxílio de cola de carbono. As amostras foram previamente secas na estufa, para se proceder ao seu revestimento com um filme de carbono, depositado pelo equipamento *EMITECH K950*. Quanto à análise qualitativa da composição elementar, esta foi realizada por difracção de electrões secundários (EDS, do inglês *energy dispersive spectroscopy*) (*Hitachi SU-70*, *Hitachi High-Technologies Europe, GmbH*, Alemanha).

3.1.3. Preparação dos Grânulos

Para escolher o dispersante a usar, foram realizados estudos acerca das interacções da superfície das partículas dos pós obtidos e a estabilidade das suspensões sem e com polifosfato de sódio. Para tal efectuaram-se medições de potencial zeta (*Malvern Zeta sizer*, *Nano ZS*, *Malvern*, *Worcestershire*, Inglaterra) com diferentes valores de pH.

Com o intuito de avaliar acerca da quantidade mínima de dispersante necessária, para atingir o valor mínimo de viscosidade das suspensões de fosfatos de cálcio, efectuaram-se medidas reológicas no equipamento *Kinexus Pro+* (*Malvern*). As medidas foram obtidas em suspensões com um teor inicial de sólidos de 35% em volume, com diferentes quantidades de polifosfato de sódio, nomeadamente, com as percentagens em peso (wt%) de 0, de 0,1, de 0,3, de 0,5, de 0,8 e de 1%, relativas à massa de sólidos. O pó de fosfato de cálcio foi gradualmente adicionado ao líquido dispersor e

misturado por agitação manual. As suspensões obtidas foram posteriormente homogeneizadas num misturador (*Thinky ARE-250*) a 800 rpm. Tendo em conta os resultados obtidos nas medições reológicas, a quantidade de dispersante necessária para se atingir o mínimo de viscosidade foi de 0,8 wt% para todas as composições de pós. A Figura 19 apresenta esquematicamente o processo de preparação das suspensões.

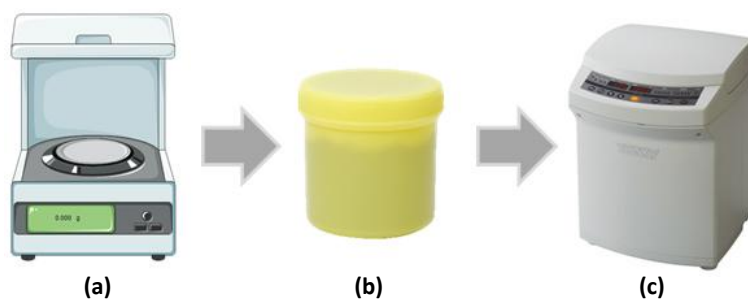


Figura 19: Esquema alusivo ao processo de preparação de suspensões: (a) Pesagem de água e de pós preparados; (b) Adição de água e de dispersante, seguida da adição manual dos pós; (c) homogeneização da suspensão no misturador.

Para a obtenção dos grânulos prepararam-se suspensões com um teor em sólidos de 50% em volume. Estas suspensões foram misturadas com uma solução de alginato de sódio (*Sigma-Aldrich*, Alemanha) a 3% peso/volume (p/v) em água destilada, de acordo com a proporção em peso de 0,8. Os grânulos foram preparados pelo método de gelificação ionotrópica, através da aspersão da mistura numa solução 1 M de CaCl_2 (*Sigma-Aldrich*, Alemanha) como agente de gelificação.² O método de gelificação ionotrópica encontra-se exemplificado na Figura 20.

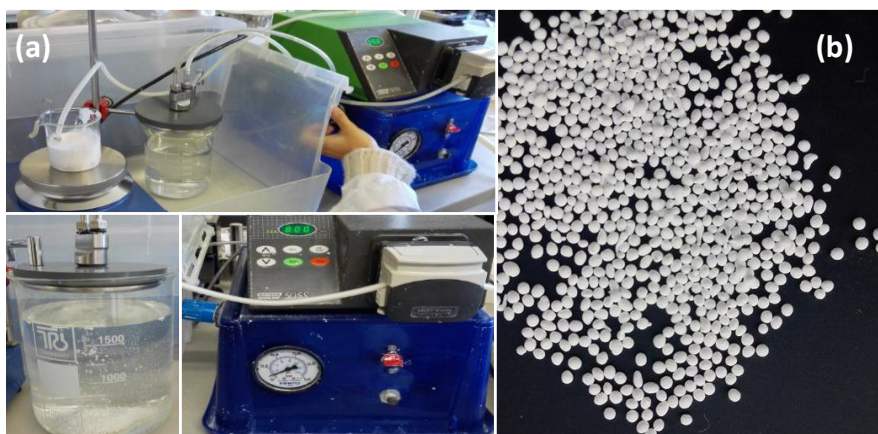


Figura 20: Método de gelificação ionotrópica: (a) A suspensão preparada foi gotejada para a solução de CaCl_2 e, através da gelificação do alginato de sódio na presença de iões Ca^{2+} , obtiveram-se os grânulos esféricos (b).

Para se realizar o processo de gotejamento foram estudados os parâmetros descritos na Tabela 5, nomeadamente, o diâmetro do bico de aspersão, o caudal da suspensão e a pressão de ar. O estudo destes parâmetros permitiu controlar o diâmetro dos grânulos. Assim, verificou-se que usando o diâmetro do bico de 1,5 mm, pressão de ar próxima de 2 kPa e diferentes caudais de suspensão (6 e 8 rpm) foi possível obter dois diâmetros de grânulos para todas as composições de pó.

Tabela 5: Parâmetros estudados no processo de gotejamento, que permitiram obter diferentes diâmetros de grânulos (grande e pequeno), para a composição pura, dopada e bifásica.

Grânulos		Parâmetros			
		Diâmetro do Bico (mm)	Caudal (rpm)		Pressão de Ar (kPa)
Composição	Diâmetro	1,5	6	8	2
Puro	Grande (≥1 mm)	✓	×	✓	✓
	Pequeno (≥0,5 mm e ≤1 mm)	✓	✓	×	✓
Dopado	Grande (≥1 mm)	✓	×	✓	✓
	Pequeno (≥0,5 mm e ≤1mm)	✓	✓	×	✓
Bifásico	Grande (≥1 mm)	✓	×	✓	✓
	Pequeno (≥0,5 mm e ≤1 mm)	✓	✓	×	✓

✓ Parâmetro usado no processo de gotejamento

× Parâmetro não usado no processo de gotejamento

Após o gotejamento, os grânulos foram mantidos durante 15 minutos na solução de CaCl_2 , de modo que se iniciasse o processo de consolidação por gelificação ionotrópica. Posteriormente, os grânulos foram lavados suavemente com água destilada e secos na estufa a 40°C, durante um dia. Terminada a secagem, estes foram peneirados no equipamento *Retsch AS200*, através de uma rede com malha de abertura de 0,5 mm e de 1 mm, para diferenciar os grânulos consoante o seu diâmetro.

Por fim, os grânulos obtidos de cada composição foram divididos em 2 grupos distintos: (i) grânulos crus, ou seja, não sujeitos a qualquer tratamento térmico posterior além da secagem; (ii) grânulos sinterizados a 900°C, durante 1 hora a 5°C/minuto. A Figura 21 representa esquematicamente os diferentes composições e diâmetros de grânulos.

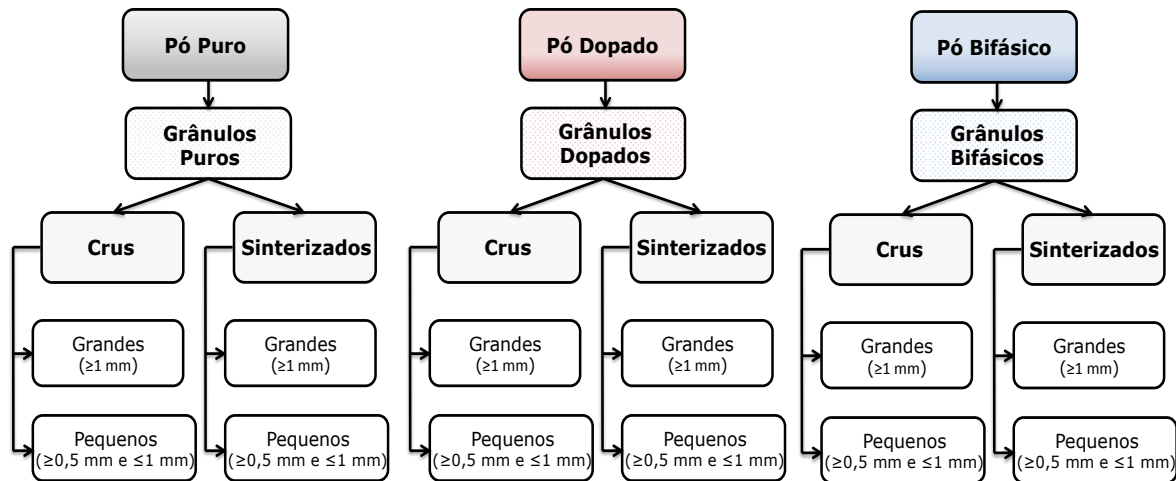


Figura 21: Esquema ilustrativo das diferentes composições e diâmetros dos grânulos preparados.

3.1.4. Caracterização do Dispersante

As interações da superfície das partículas dos pós e a estabilidade das suspensões sem e com polifosfato de sódio foram estudadas, através de medições de potencial zeta (*Malvern Zeta sizer, Nano ZS, Malvern, Worcestershire, Inglaterra*) a diferentes valores de pH. As suspensões preparadas foram diluídas por ultra-sons durante 10 minutos, seguindo-se um período de repouso de 30 minutos, para permitir a sedimentação das partículas de maiores tamanhos. Retirou-se uma alíquota do sobrenadante e ajustou-se o seu pH com ácido clorídrico (HCl) a 0,1 M e hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M, de modo a diminuir ou aumentar o valor do pH, respectivamente, para se proceder às medições de potencial zeta.

3.1.5. Caracterização das Suspensões

As suspensões obtidas foram caracterizadas consoante o seu comportamento reológico, num equipamento *Kinexus Pro+* (*Malvern*), como mencionado. Assim, os ensaios de viscosidade foram realizados à temperatura de 25°C, durante 5 minutos e a velocidades de corte entre a gama 0,1 s⁻¹ e 600 s⁻¹.

3.1.6. Caracterização dos Grânulos

A porosidade dos grânulos foi determinada pelo teste de absorção de água e por microscopia electrónica de varrimento (SEM).

A absorção de água é definida como o ganho percentual de massa que tem a amostra, quando absorve o máximo de água. Para tal, foi registado a massa da amostra seca e seguiu-se a sua imersão em água durante 2 horas. Após este período, os grânulos foram colocados num pano húmido, para limpar a água na sua superfície, de modo que esta apenas ficasse retida nos seus poros e registou-se a massa húmida. A absorção de água foi calculada através da Equação 1:

$$\text{Absorção de água (\%)} = \frac{M_H - M_A}{M_A} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde M_H é a massa (g) da amostra húmida com água absorvida e M_A é a massa (g) da amostra seca.

A morfologia dos grânulos de fosfato de cálcio foi analisada por microscopia electrónica de varrimento, usando o equipamento descrito anteriormente. Os grânulos foram observados quanto à sua morfologia exterior e morfologia interior, sendo sujeitos a uma preparação prévia. Para a observação da morfologia externa dos grânulos, ou seja, a superfície, estes foram colados inteiros no porta-amostras de alumínio, com auxílio da cola de carbono. Enquanto para a observação da morfologia interior, os grânulos foram colocados em resina epóxi (araldite), polimerizada com endurecedor, seguindo-se o seu polimento (40 nm). Após o polimento, as amostras também foram colocadas no porta-amostras de alumínio com cola de carbono. Posteriormente, as amostras foram secas na estufa, para se proceder ao seu revestimento com um filme de carbono, depositado no equipamento *EMITECH K950*.²

3.2. Estudos de Impregnação de Fármaco e Ensaio *in vitro*

Para prosseguir os estudos, escolheu-se apenas uma composição e um diâmetro de grânulos. Assim, os grânulos bifásicos pequenos ($\geq 0,5$ mm e ≤ 1 mm) foram impregnados com doxorrubicina (DOX), como está esquematizado na Figura 22.

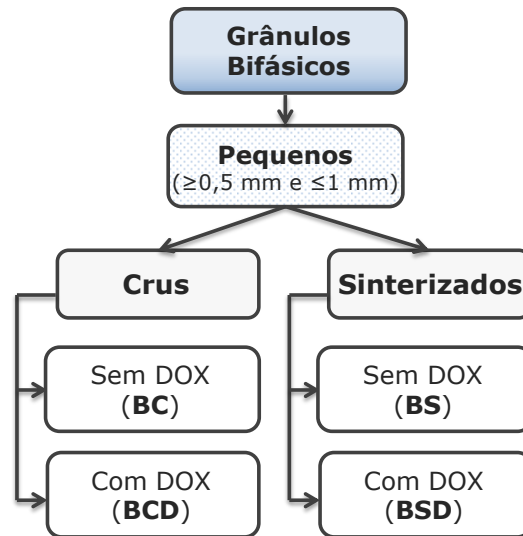


Figura 22: Esquema referente à composição de grânulos escolhida para os estudos de impregnação de DOX e ensaios *in vitro*, e a sua respectiva nomenclatura. BC: Grânulos Bifásicos Crus sem DOX; BCD: Grânulos Bifásicos Crus com DOX; BS: Grânulos Bifásicos Sinterizados sem DOX; BSD: Grânulos Bifásicos Sinterizados com DOX.

3.2.1. Biocompatibilidade *in vitro* dos Grânulos em SBF

A biocompatibilidade *in vitro* dos grânulos foi determinada, através do estudo do comportamento destes em plasma humano simulado (SBF).

3.2.1.1. Preparação da Solução de SBF

Segundo o procedimento descrito por Cüneyt Tas (2000), preparou-se uma solução de SBF, com $\text{pH} \approx 7,4$ e à temperatura de 37°C . Os reagentes foram adicionados um por um, depois de cada reagente ser completamente dissolvido em 700 ml de água desionizada, seguindo a ordem descrita na Tabela 6.⁸⁸

Tabela 6: Composição química da solução de SBF (adaptado de [88]).

Ordem	Reagente	Fabricante	Massa (g)
1º	NaCl		6,547
2º	NaHCO ₃		2,268
3º	KCl		0,373
4º	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Sigma- Aldrich	0,178
5º	MgCl ₂ ·6H ₂ O		0,305
6º	CaCl ₂ ·2H ₂ O		0,368
7º	Na ₂ SO ₄		0,071
8º	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂		6,057

Seguidamente procedeu-se à titulação da solução de SBF com HCL (1 M), até se atingir o valor de pH de 7,4 a 37°C. Durante o processo de titulação, a solução foi continuamente diluída com água desionizada, com o fim de se obter 1 litro de volume final. Assim, a concentração de iões inorgânicos na solução final de SBF é semelhante à do plasma humano sanguíneo, como se pode verificar na Tabela 7.

Tabela 7: Concentração de iões no plasma humano simulado (SBF) e no plasma humano sanguíneo, de acordo com a norma ISSO (10-3mol/l) (adaptado de [88]).

Iões	SBF (pH 7,40)	Plasma Sanguíneo (pH 7,2 – 7,4)
Na ⁺	142	142
Cl ⁻	125	103
HCO ₃ ⁻	27	27
K ⁺	5	5
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
HPO ₄ ²⁻	1	1
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

3.2.1.2. Envelhecimento das Amostras na Solução de SBF

Colocaram-se 2 g de cada composição dos grânulos em 10 ml de solução de SBF, em frascos de polietileno fechados. Estes foram colocados numa estufa a 37°C, sob agitação orbital a 75 movimentos por minuto (*Edmund Bühler GmbH*, Alemanha). Concluídos os tempos pré-determinados, 24 horas, e 7, 14 e 28 dias, removeram-se as amostras da solução de SBF e procedendo-se à sua lavagem suave com água desionizada, seguida de uma secagem a 37°C.

3.2.1.3. Caracterização das Amostras em SBF

A microestrutura exterior dos grânulos após diferentes tempos de imersão em SBF foi analisada, através da microscopia electrónica de varrimento. Para tal, as amostras foram preparadas seguindo o procedimento anteriormente descrito.

3.2.2. Impregnação de DOX nos Grânulos Bifásicos

No presente trabalho, os grânulos preparados distinguem-se pela estratégia de incorporação da DOX (na etapa de formação dos grânulos ou após tratamento térmico) e pela quantidade de droga incorporada. Devido a limitações em termos de quantidade de droga disponível, o teor nos grânulos crus foi cerca de metade.

Os grânulos sinterizados foram impregnados com doxorubicina (BSD), através da sua imersão numa solução de fármaco (0,9 g DOX/g pó), por um período de uma hora, na ausência de luz.

Os grânulos bifásicos crus com doxorubicina (BCD) foram impregnados através do processo de gelificação ionotrópica, descrito anteriormente. As suspensões com um teor em sólidos de 50% em volume foram misturadas com a solução de alginato de sódio a 3% (p/v), de acordo com a razão em peso de 0,8, e com 0,5 g DOX/g pó (na ausência de luz, já que a DOX é fotossensível). A mistura final foi gotejada para a solução de CaCl₂, usando como parâmetros de gotejamento 6 rpm de caudal, 1,5 mm de bico de aspersão e 2 kPa de pressão de ar. Posteriormente, os grânulos foram lavados suavemente com água destilada e secos na estufa 40°C, durante um dia.

No final, todos os grânulos preparados foram congelados em azoto líquido e liofilizados a -51°C e sob vácuo parcial de 1,5 Pa (*Labconco*, Estados Unidos da América), durante 24 horas. Posteriormente, os grânulos foram esterilizados no

Hospital de Aveiro, numa manga de esterilização por plasma, composta por um filme transparente de poliéster e polietileno, conforme as normas EN 868/ ISO 11607.

3.2.3. Curva de Calibração de DOX

Para a análise da eficiência de incorporação e de libertação da DOX nos grânulos preparados foi necessário preparar curvas de calibração em ácido HCl a 0,25 M e em solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*), constituída por 137 mM de cloreto de sódio (*Sigma S7653*), 2,7 mM de cloreto de potássio (*Sigma P9333*), 10 mM de fosfato monossódico (*Sigma S5011*) e 1,8 mM de fosfato monopotássio (*Sigma P0662*), a pH 7,4.

Desse modo, partiu-se de uma solução mãe de DOX (2mg/ml) e por diluição prepararam-se várias soluções de trabalho com concentrações diferentes, numa placa preta de 96 poços (*SIGMA CLS3596*), que está indicada para reduzir as interferências nos ensaios de fluorescência. A leitura foi realizada no leitor de microplacas *Synergy HT Multi-Detection* (*BioTeK*, Estados Unidos da América) usando a fluorescência de cada amostra com excitação de 470 nm e com emissão de 580 nm⁸⁹. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e a partir dos valores obtidos foram traçadas curvas, para determinar a concentração da DOX, usando o modelo exponencial e a Equação 2, através do software *Origin* (versão 9.0, *OriginLab Corporation*).

$$y = y_0 + A^{\exp(R0 \times x)} \quad (\text{Equação 2})$$

3.2.4. Eficiência de Incorporação

A massa total de fármaco incorporada (ng DOX/mg grânulos) foi determinada após a digestão completa dos grânulos em HCl na concentração de 0,25 M.² Assim, pesaram-se 3 mg dos grânulos com e sem DOX (BCD, BSD, BC e BS), sendo colocados em 1 ml de HCl, durante 24 horas sob agitação. Os grânulos sem fármaco foram usados como um controlo, com o intuito de perceber o limite de detecção de DOX. Ao fim deste período, recolheu-se 100 µl de solução de cada composição e colocaram-se numa placa preta de 96 poços. As medições de fluorescência dos ensaios foram efectuadas no leitor de microplacas *Synergy HT Multi-Detection* (excitação 470 nm/emissão 580 nm). Por último, usando a curva de calibração da DOX em HCl, obtida no software *Origin 9.0*, determinou-se a concentração de DOX presente em

cada composição de grânulos, que corresponde à sua fluorescência. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.2.5. Estudo da Liberação da Doxorubicina em PBS

O estudo da liberação de DOX nos grânulos em PBS foi realizado de acordo com a norma 10993-5 da ISO - *Biological evaluation of medical devices*, que refere que a massa por volume de extracção recomendada é 0,1 g/ml. Para o efeito, pesaram-se os grânulos BCD e BSD, que foram colocados em PBS em distintos *eppendorfs*, consoante os tempos de incubação pré-determinados, de 2, de 6, de 24 e de 48 horas. Os *eppendorfs* foram mantidos sob agitação numa incubadora humificada (*HERAcell® 150, Thermo Electron Corporation*) a 37°C, com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Concluídos os tempos, recolheram-se 100 µl solução de cada *eppendorfs* e o volume foi colocado em placas pretas de 96 poços. A fluorescência das amostras foi determinada pelo leitor de microplacas *Synergy HT Multi-Detection* (excitação 470 nm/emissão 580nm). Por fim, usando a curva de calibração da DOX em PBS, elaborada no *software Origin 9.0*, determinou-se a concentração de DOX nos diferentes grânulos, que corresponde à fluorescência de cada tempo estudado. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.2.6. Ensaios de Actividade Biológica na Linha Celular de Osteossarcoma Humano MNNG/HOS

A descrição da linha celular usada e a sua cultura para os estudos de actividade biológica encontram-se seguidamente descritas.

3.2.6.1. Linha Celular e Cultura de Células

O presente trabalho utilizou células da linha celular humana de osteossarcoma MNNG/HOS (*ATCC®CRL-1547™*). A linha celular foi obtida da *American Type Cell Culture Collection* (*ATCC, Rockville, MD, Estados Unidos da América*) e cultivada em meio Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, DMEM (*Sigma, D5648*), suplementado com 5% de soro de bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) (*Sigma, F7524*), 1% de antibiótico (*Sigma A5955*) e 0,25 mM de piruvato de sódio (*Gibco 11360*). As células foram descongeladas e propagadas em cultura aderente, de acordo com as instruções

do fornecedor e mantidas numa incubadora humificada (*HERAcell® 150, Thermo Electron Corporation*) a 37°C, com 95% de ar e 5% de CO₂.

Para a realização dos estudos foi necessário preparar suspensões celulares das células em cultura aderente. Sucintamente, após remoção do meio celular, procedeu-se à lavagem das células com PBS. De seguida, descartou-se o PBS e incubaram-se as células com 2 ml de solução de tripsina-EDTA a 0,25% (*Sigma T-4049*), durante 3 a 5 minutos, para a desagregação celular. Terminando este tempo, adicionaram-se 5 ml de meio de cultura, com o fim de inibir a acção da tripsina, e procedeu-se à determinação da concentração celular.

De seguida, retirou-se uma amostra de suspensão celular e adicionou-se igual volume de uma solução de azul tripano (*Sigma T0776*) e contaram-se as células, com o auxílio de uma câmara de *neubauer* e um microscópio invertido (*Motic AE31*) com ampliação 100x. Após a contagem, retirou-se o volume necessário, centrifugou-se a suspensão celular a 1000 rpm durante cinco minutos (*Heraeus Multifuge IL-R*; raio do rotor 18,7 cm) e adicionou-se o meio de cultura necessário para os ensaios a realizar.

3.2.6.2. Estudos de Citotoxicidade

Para realizar os estudos de citotoxicidade foi necessário condicionar os grânulos em meio cultura e elaborar curvas de dose-resposta, de modo a determinar a percentagem da viabilidade celular, como se pode observar na Figura 24.

As células em cultura foram transferidas para placas de 46 poços numa densidade de 1×10^5 células/poço em 0,5 ml de meio de cultura DMEM e incubadas a 37°C durante 24 horas, numa atmosfera humedecida com 5% de CO₂ e 95% de ar. Após este período de incubação adicionaram-se às células os meios previamente condicionados pelos grânulos.

Tendo em conta a norma 10993-5 da ISO - *Biological evaluation of medical devices*, que refere que a massa por volume de extracção recomendada é de 0,1 g/ml, os grânulos esterilizados foram incubados no meio de cultura DMEM. Assim, colocaram-se os grânulos e o meio de cultura em *falcons* sob agitação, durante 24 horas, na incubadora humificada a 37°C, com 95% de ar e 5% de CO₂. Decorrido este tempo, centrifugaram-se e filtraram-se as soluções com um filtro de tamanho de 40 nm, com o fim de obter apenas o meio condicionado, para posterior aplicação nas células.

Seguidamente, o meio das placas de 46 poços foi removido, excepto nos poços denominados por “Controlo”. Para os poços designados por “DMEM” o meio

removido foi substituído por novo meio de cultura DMEM. Enquanto o meio dos restantes poços foi substituído por diluições da concentração de meio condicionado: de 3%, de 6%, de 12%, de 25%, de 50% e de 100%. Estes ensaios foram realizados com diferentes tempos de incubação, de 48 horas e de 96 horas, e em triplicado, para o BC, o BCD, o BS e o BSD (Figura 24).

Como exposto no capítulo 2, o ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi o ensaio colorimétrico utilizado, que permite determinar a actividade mitocondrial pela redução metabólica de um sal amarelo solúvel de tetrazólio num produto insolúvel, o formazano, como se pode observar na Figura 23. Esta reacção converte os sais de amarelo para azul de formazano, que podem ser dissolvidos num solvente orgânico, o isopropanol. Assim, qualquer aumento ou diminuição no número das células viáveis é detectado por um espectrofotómetro, pela quantificação da intensidade da solução.⁹¹

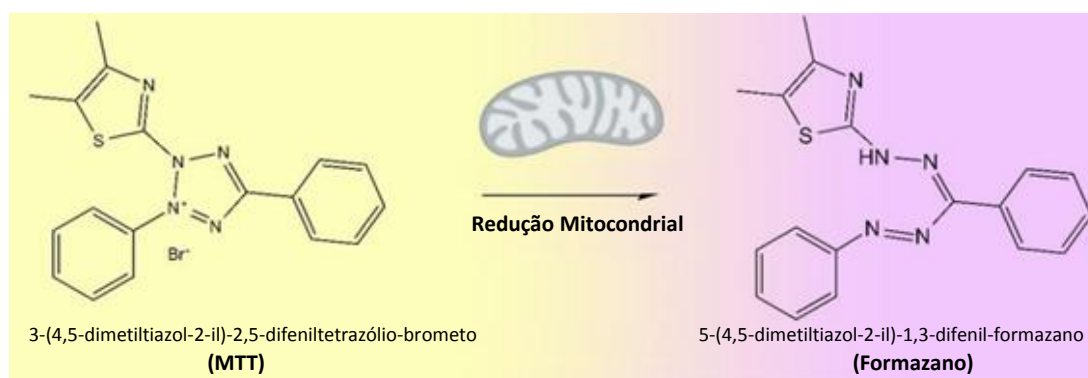


Figura 23: Reacção de redução metabólica de MTT em formazano (adaptado de [91]).

Desse modo, terminado o período de incubação, removeram-se os meios de cultura das placas e as células foram lavadas com PBS. Adicionaram-se a cada poço 150 µl de uma solução de MTT 5 mg/ml (M2128, Sigma-Aldrich). As células foram colocadas imediatamente na incubadora durante 3 horas, para ocorrer a redução do MTT e levar à formação dos cristais de formazano. Ao fim deste período, adicionaram-se 150 µl de uma solução de isopropanol ácido a 0,004 M, para dissolver os cristais de formazano, e transferiram-se 200 µl de amostra de cada poço para uma placa de 96 poços. Por fim, efectuou-se a leitura de absorvância no leitor de microplacas Elisa Synergy HT Multi-Detection (BioTeK, Estados Unidos da América) com filtro de referência de 620 nm e de leitura a 570 nm.

A percentagem da actividade metabólica foi calculada, de acordo com a Equação 3.⁹²

$$\text{Atividade metabólica (\%)} = \frac{\text{Absorvância (amostra)}}{\text{Absorvância (controlo)}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

A partir dos valores obtidos foram traçadas curvas de dose-resposta em coordenadas semilogarítmicas. Estas curvas foram ajustadas a uma função sigmóide, de acordo com a Equação 4, tendo-se determinado a concentração de DOX necessária para inibir a proliferação celular em 50% (IC₅₀, do inglês *half maximal inhibitory concentration*). O procedimento de ajuste das curvas foi feito com *software Origin* (versão 9.0, *OriginLab Corporation*).

$$y = A1 + \frac{A1-A2}{1+10^{(\log x0-x)p}} \quad (\text{Equação 4})$$

Segundo a Equação 4, o y é a resposta medida, $A1$ é o valor máximo de y , $A2$ é o valor mínimo de y , $x0$ é o IC₅₀ e p o declive da curva ajustada. Foram obtidos os intervalos de confiança a 95 % para o IC₅₀ a partir dos parâmetros obtidos pelo ajuste da curva ($\log x0$ e respectivo erro padrão).

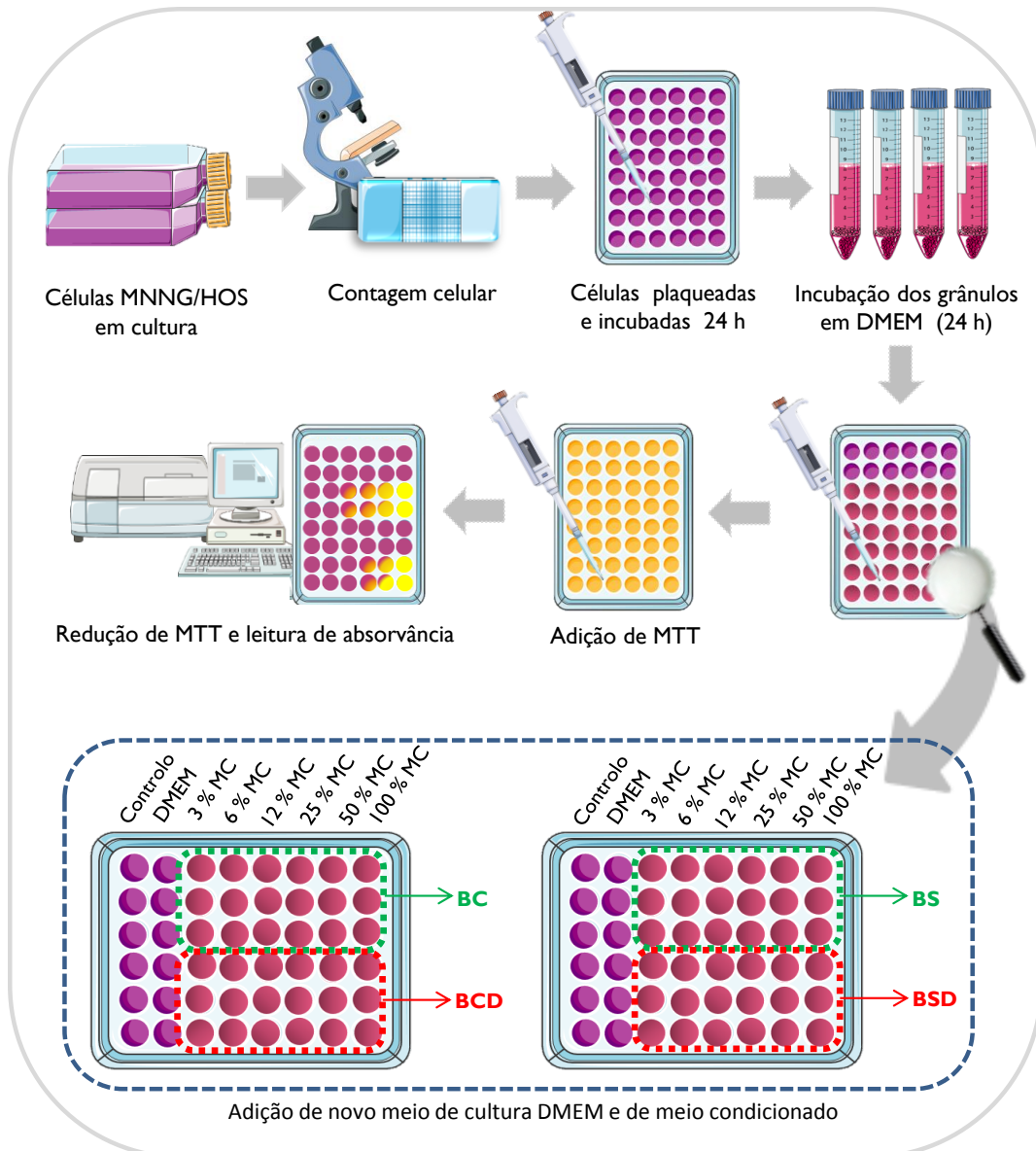


Figura 24: Etapas efectuadas para os ensaios de actividade metabólica, usando células da linha celular derivada de osteossarcoma humano (MNNG/HOS). As células cultivadas foram transferidas numa densidade de 1×10^5 células/poço para as placas, sendo incubadas durante 24 horas. Seguidamente procedeu-se à incubação dos grânulos BC, BCD, BS e BSD em meio de cultura DMEM durante 24 horas. Concluídos os tempos de incubação, removeu-se o meio dos poços das placas, excepto nos poços designados por “Controlo”. Aos poços nomeados por “DMEM” foi adicionado novo meio de cultura DMEM e os restantes poços foi adicionado meio condicionado, na seguinte diluição: 3, 6, 12, 25, 50 e 100%. Por fim, adicionou-se a solução de MTT às células e foi realizada a leitura da sua absorvância, de modo a determinar a percentagem da actividade celular.

3.2.7. Análise Estatística

Os resultados experimentais são apresentados como a média \pm desvio padrão (SD, do inglês, *standard deviation*) do número de ensaios indicados. A comparação da capacidade de incorporação de DOX entre os grânulos crus e sinterizados foi

realizada pelo teste t-student. Para a comparação da capacidade de libertação de DOX entre os grânulos crus e sinterizados, ao longo dos tempos pré-determinados, recorreu-se ao teste t-student nos casos em que as amostras apresentaram uma distribuição normal e ao teste não-paramétrico de Mann Whitney no caso contrário. Os parâmetros que definem as curvas de dose-resposta relativas aos resultados da actividade metabólica foram comparados utilizando o teste t-student. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada com recurso ao *software IBM® SPSS® versão 20*.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos Pós

Uma análise visual aos pós preparados permite verificar uma diferença na tonalidade destes. Enquanto os pós da composição pura de β -fosfato tricálcico e da mistura bifásica apresentam cor branca, o pó de β -fosfato tricálcico dopado apresenta uma tonalidade cor-de-rosa, sendo o manganês o responsável por esta diferença.^{47,85}

4.1.1. Difraccção de Raios-X

As fases cristalinas presentes nos pós obtidos por precipitação química a partir das soluções dos sais precursores foram analisadas por difracção de raios-X (DRX). A Figura 25 apresenta os difractogramas obtidos para as diferentes composições, pura, dopada e bifásica, calcinadas a 800°C, durante 2 horas e com uma taxa de aquecimento de 5°C/minuto. Os difractogramas foram analisados com o recurso aos ficheiros de PDF (*Powder Diffraction Files*) do ICDD (*International Center for Diffraction Data*), com a informação cristalográfica, que melhor se ajusta e quantifica cada fase específica que o espectro de DRX contém. Para tal, usaram-se os padrões de DRX para as fases cristalinas de β -fosfato tricálcico, de pirofosfato de cálcio e de hidroxiapatite (Figura 25).

Todas as composições exibiram difractogramas semelhantes, no entanto os resultados obtidos revelam que após o tratamento térmico a 800°C, os pós apatíticos apresentam fases cristalinas mais bem definidas, nomeadamente, o β -fosfato tricálcico, no caso do pó puro ($\text{Ca/P}=1,5$ e $\text{pH}\approx 7$) e dopado ($\text{Ca/P}=1,5$ e $\text{pH}\leq 7$), e também a fase cristalina da hidroxiapatite, no caso do pó bifásico ($\text{Ca/P}=1,55$ e $\text{pH}\approx 7,7$) (Figura 25). Pode observar-se que os picos mais intensos de todos os espectros de raios-X são os correspondentes à fase cristalina de β -fosfato tricálcico, quando $2\theta=27,82^\circ$, $2\theta=31,03^\circ$ e $2\theta=34,40^\circ$. Apesar dos iões dopantes terem um papel de estabilizador térmico da fase de β -fosfato tricálcico, retardando a sua transformação em α -fosfato tricálcico, a composição dopada apresenta vestígios de uma segunda fase cristalina, designadamente, o pirofosfato de cálcio. Tal facto pode ser justificado pelo pH usado no processo de síntese deste pó, uma vez que é fundamental que se mantenha o $\text{pH}\leq 7$, devido à presença de manganês, já que os iões de Mn^{2+} apenas são estáveis em soluções ácidas. Porém, este pH e a razão molar Ca/P usada são parâmetros propícios

à formação de pequenas quantidades de pirofosfato de cálcio. É de realçar, que em condições neutras os íons de Mn^{2+} em excesso (não incorporados na rede cristalina dos fosfatos de cálcio) precipitam como $Mn(OH)_2$ que confere aos pós uma coloração rosa. Em condições alcalinas tende a formar-se um composto mais oxidado, o $MnO(OH)_2$ (cor castanha), que pode ser tóxico para o corpo humano.^{47,85,93} Quanto à composição pura, esta também apresentou a formação vestigial de uma segunda fase cristalina, a hidroxiapatite. Relativamente à composição bifásica verifica-se que além dos picos mais intensos β -fosfato de tricálcico, esta apresentou também picos intensos correspondentes à fase cristalina de hidroxiapatite, quando $2\theta=31,78^\circ$ e $2\theta=25,86^\circ$, confirmando a formação de uma mistura bifásica (Figura 25).

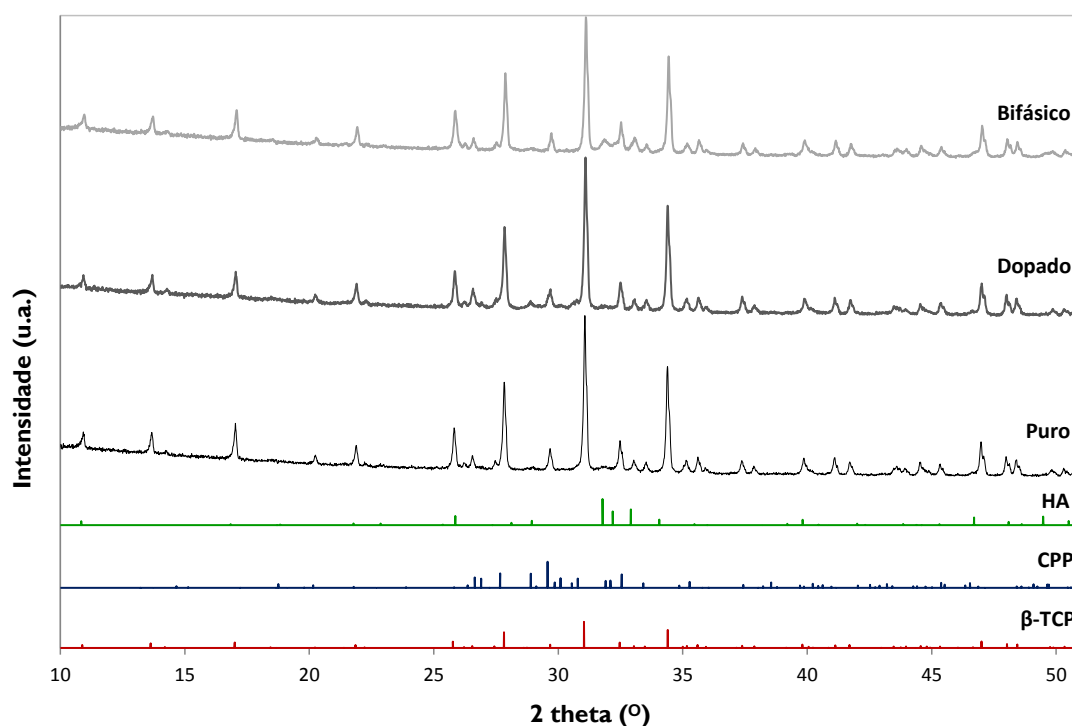


Figura 25: Difratogramas da composição de β -TCP puro, β -TCP dopada e bifásica (HA e β -TCP) calcinadas a 800°C e os padrões de DRX para as fases HA, CPP e β -TCP.

O cálculo da percentagem de fases presentes em cada uma das composições de pós foi estimado pelo *software High Score Plus Xpert-pro PANalytical*, com base nas áreas dos picos dos espectros obtidos por difração de raios-X e os resultados destes cálculos encontram-se na Tabela 8. Assim sendo, os pós puro e dopado são compostos maioritariamente por β -fosfato tricálcico, e o pó bifásico é constituído por uma mistura de 84 % de β -fosfato tricálcico e de 16 % de hidroxiapatite.

Tabela 8: Percentagem de fases dos pós calcinados a 800°C, calculadas através das fases dos espectros obtidos por difracção de raios-X.

Fase Cristalina	Puro	Dopado	Bifásico
β -TCP	98 %	98 %	84,4 %
CPP	-	2 %	-
HA	2 %	-	15,6 %

A variabilidade de razões molares de Ca/P dos precipitados de fosfatos de cálcio, a temperatura, o pH e a duração do processo de síntese por via húmida são parâmetros essenciais, que se devem controlar e otimizar, de modo a obter produtos finais com as fases cristalinas desejadas.^{47,86,87}

Tendo em conta os objectivos do presente trabalho, a preparação de grânulos porosos multifuncionais, ou seja, com capacidade de regeneração óssea e de libertação controlada de fármacos *in situ*, escolheu-se como temperatura de calcinação 800°C. Esta temperatura permitiu formar as fases pretendidas nos pós preparados, bem como formar partículas porosas com uma maior área superficial específica, sendo ideais para a incorporação de agentes químicos e para a degradabilidade dos *scaffolds* produzidos.²⁴ A temperatura de calcinação é um parâmetro crucial, de modo a controlar o crescimento de grãos, a microestrutura e as propriedades mecânicas. À medida que a temperatura de calcinação aumenta, ocorre a difusão das partículas (difusão das fronteiras de grão), que induz a diminuição da sua superfície e aumento da sua densidade (partículas mais definidas), que resulta na diminuição da sua porosidade.^{50,94}

4.1.2. Distribuição Granulométrica

As distribuições dos tamanhos (diâmetros) de partícula dos diferentes pós, após calcinação e moagem, estão apresentadas na Figura 26. As medidas foram repetidas pelo menos três vezes e adoptou-se uma curva representativa para cada amostra. Todas as composições apresentaram uma distribuição de partículas trimodal, ou seja, exibem curvas com três populações distintas. A primeira população é referente às partículas primárias individualizadas, numa gama submicrométrica de tamanhos entre 0,08 μm e 0,1 μm . As restantes populações correspondem à aglomeração destas

partículas, que se traduzem em tamanhos de partículas maiores, como se pode observar na gama de tamanhos entre 0,6 μm e 1,5 μm .

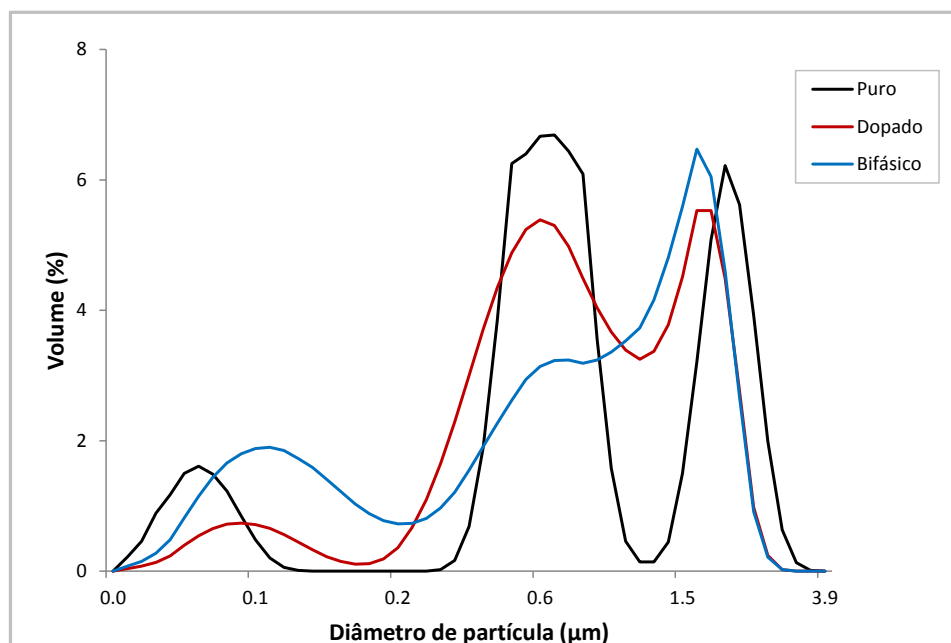


Figura 26: Distribuição diferencial do tamanho de partícula dos pós puro, dopado e bifásico, após calcinação e moagem.

A Tabela 9 apresenta os tamanhos abaixo dos quais existem determinadas percentagens volumétricas (10%, 25%, 50%, 75% e 90%) de partículas na curva de distribuição cumulativa inferior, os tamanhos médios de partículas e os respectivos valores do desvio padrão. Os tamanhos médios de partícula dos pós foram de cerca de $1,04 \pm 0,69 \mu\text{m}$ para a composição pura, $0,99 \pm 0,63 \mu\text{m}$ para a composição dopada e de $0,97 \pm 0,69 \mu\text{m}$ para a composição bifásica. Embora os tamanhos médios de partículas sejam idênticos, cerca de $1,0 \mu\text{m}$, os pós dopados e bifásicos apresentaram distribuições granulométricas mais alargadas, com presença de alguns aglomerados de partículas. Por outro lado, os valores relativamente elevados dos desvios padrão podem entender-se considerando as diferentes populações de partículas presentes em cada pó (Figura 26).

Tabela 9: Tamanhos abaixo dos quais existem determinadas percentagens volumétricas (10%, 25%, 50%, 75% e 90%) de partículas na curva de distribuição cumulativa inferior, bem como o diâmetro médio e o desvio padrão para cada composição de pó estudada, após a sua calcinação e moagem.

Composição	<10% (μm)	<25% (μm)	<50% (μm)	<75% (μm)	<90% (μm)	Média (μm)	SD (μm)
Puro	0,11	0,56	0,74	1,76	2,30	1,04	0,69
Dopado	0,33	0,51	0,79	1,49	1,96	0,99	0,63
Bifásico	0,10	0,33	0,85	1,56	1,96	0,97	0,69

Segundo Wang et al., (2014), os tamanhos das partículas e a sua distribuição são parâmetros de extrema importância, dado que afectam a densidade de empacotamento das partículas e as propriedades finais do produto obtido.⁵⁰

Para a preparação de grânulos foi necessário a preparação de suspensões concentradas (percentagem de sólidos elevadas), de forma a evitar retracções durante as etapas de secagem e de sinterização, bem como o melhoramento das propriedades dos produtos finais.⁹⁵ Para tal os pós deverão ter um tamanho de partículas médio entre 1 e 2 μm .² Os resultados obtidos confirmam que a moagem foi efectiva e que as partículas e a sua distribuição estão dentro da gama de tamanhos, que são adequados para a preparação de suspensões concentradas.

4.1.3. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Difracção de Electrões Secundários (EDS)

As imagens obtidas pela análise da microscopia electrónica de varrimento (SEM) às partículas das composições estudadas estão presentes na Figura 27. Através das imagens é possível verificar que as partículas de todas as composições apresentam uma morfologia irregular e/ou heterogénea e a presença de aglomerados, devido à resistência de algumas partículas à etapa de moagem a seco e resultantes da temperatura de calcinação à qual foram sujeitas (800°C).^{50,94} Tendo em conta os resultados obtidos anteriormente, o pó puro apresentou um tamanho de partícula mais uniforme, com uma distribuição mais estreita (Figura 27 [a]), enquanto os pós dopado e bifásico apresentaram partículas com gamas de tamanhos mais alargadas (Figura 27 [b e c]). Assim, as imagens obtidas estão em concordância com o que se

verificou nas análises de distribuição de tamanhos de partícula, apresentadas anteriormente (Figura 26).

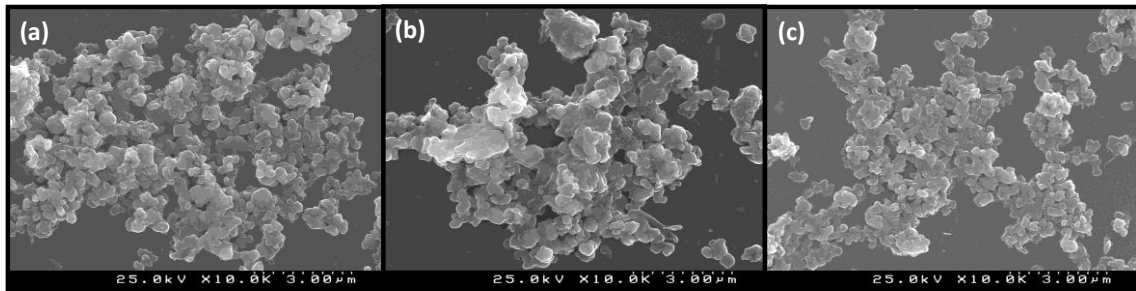


Figura 27: Imagens de SEM das partículas de pó puro (a), dopado (b) e bifásico (c).

Os pós preparados foram sujeitos à difração de electrões secundários (EDS), com o intuito de analisar qualitativamente a sua composição elementar. As Figura 28, Figura 29 e Figura 30 são referentes aos espectros de EDS do pó puro, dopado e bifásico, respectivamente.

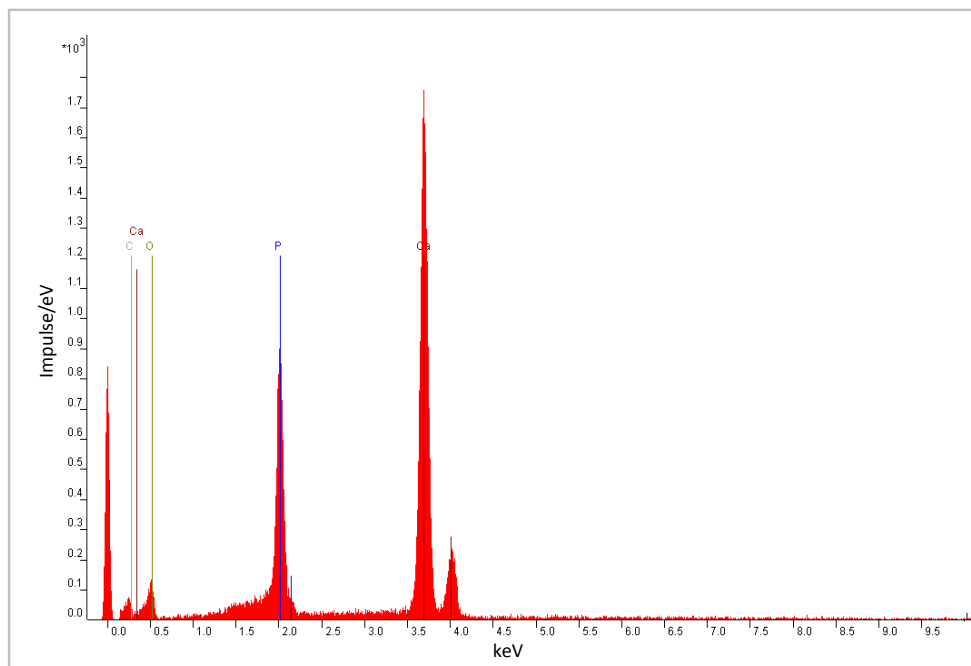


Figura 28: Espectro de EDS do pó puro calcinados a 800°C.

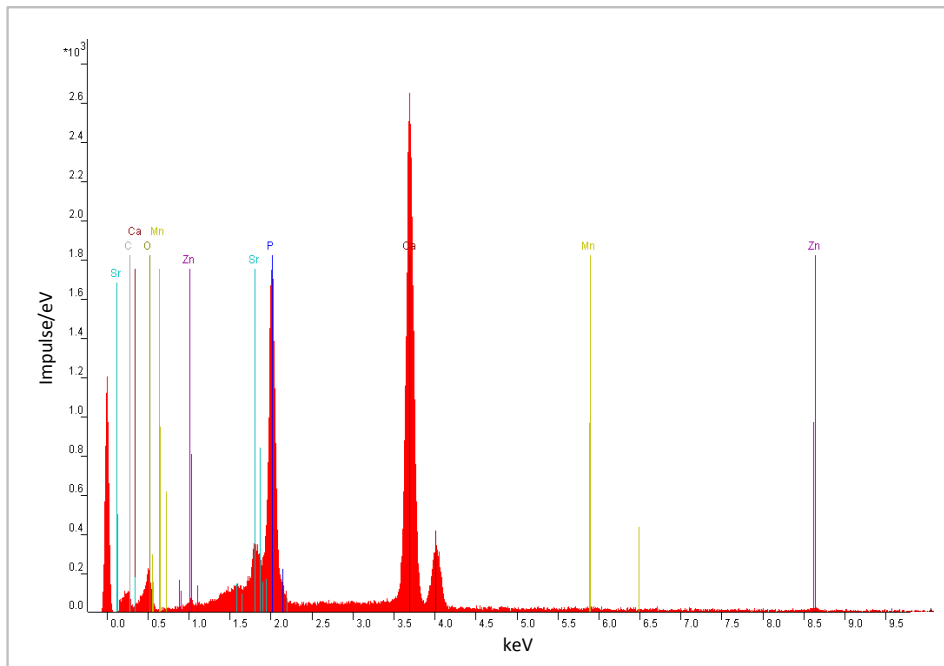


Figura 29: Espectro de EDS do pó dopado calcinados a 800°C.

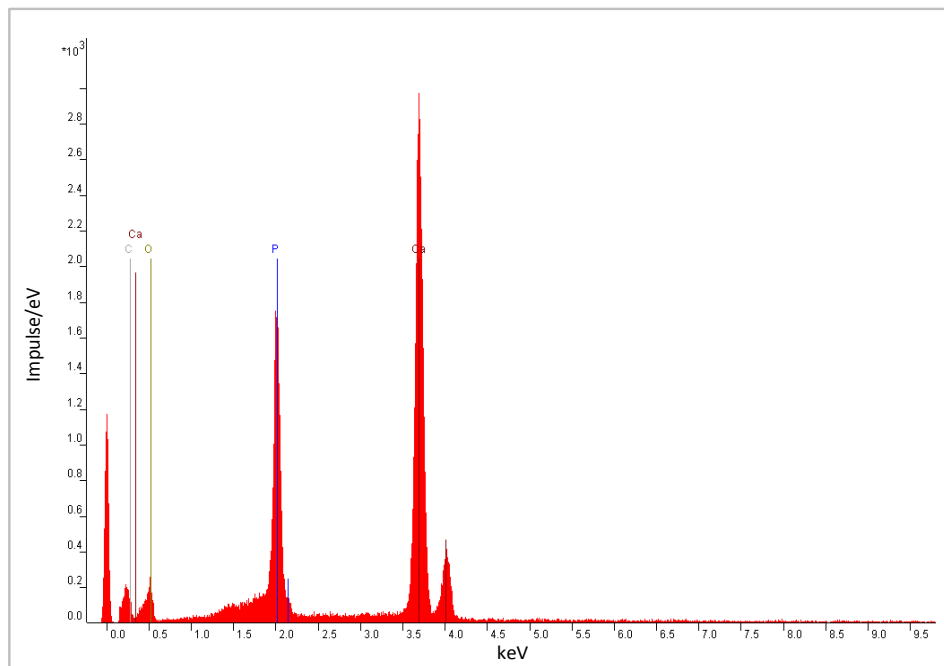


Figura 30: Espectro de EDS do pó bifásico calcinados a 800°C.

Os resultados obtidos permitem identificar a presença dos íons Ca e P em maior quantidade em todos os pós, ou seja, confirma-se a formação de um fosfato de cálcio. Como seria de esperar, no pó dopado verifica-se ainda a presença dos íons dopantes, nomeadamente, o zinco, o estrôncio e o manganês.

4.2. Caracterização dos Grânulos

Para preparar os grânulos pretendidos, foram realizados estudos acerca das interações das partículas dos pós e da quantidade mínima de dispersante necessária para a preparação de suspensões, bem como dos efeitos destes factores na porosidade final dos grânulos. Para a produção dos grânulos multifuncionais (regeneração óssea e libertação controlada de fármacos) foram tentadas duas estratégias diferentes: (i) grânulos crus, isto é, não sujeitos a qualquer tratamento térmico posterior além da secagem; (ii) grânulos sinterizados a 900°C durante 1 hora, usando uma taxa de aquecimento de 5°C/minuto.

4.2.1. Selecção do Dispersante e Avaliação da sua Eficácia

Um dos requisitos essenciais para a produção de grânulos é a obtenção de suspensões concentradas. Em geral, o comportamento reológico de suspensões concentradas é afectado por um conjunto de factores que inclui a fracção de sólidos, a morfologia, o tamanho e a distribuição de partículas, e as interações entre as partículas, as quais, por sua vez, dependem de factores químicos, tais como o pH ou os agentes dispersantes.⁹⁶ Como nos grânulos crus não ocorre a queima e, conseqüentemente, a eliminação de componentes orgânicos derivados do seu processo de produção, o dispersante a usar, para além de permitir obter um comportamento reológico adequado para as suspensões (homogéneas e bem desfloculadas), não deve ser tóxico quando em contacto com fluidos biológicos, uma vez que pode comprometer o uso destes grânulos em aplicações *in vitro* e *in vivo*.

O polifosfato de sódio tem sido recentemente estudado e ganhou destaque no campo dos polímeros inorgânicos e polielectrólitos, devido às suas aplicações na área da biologia, farmacologia e ciência dos materiais como, por exemplo, em sistemas de entrega terapêutica ou como agentes dispersantes e modificadores reológicos.⁹⁷ Por estas características o polifosfato de sódio foi o dispersante escolhido, para a preparação das suspensões, para a posterior obtenção de grânulos.

De modo a estudar as interações das partículas dos pós e a estabilidade das suspensões sem e com polifosfato de sódio, foram realizadas medições de potencial zeta, como se pode observar na Figura 31.

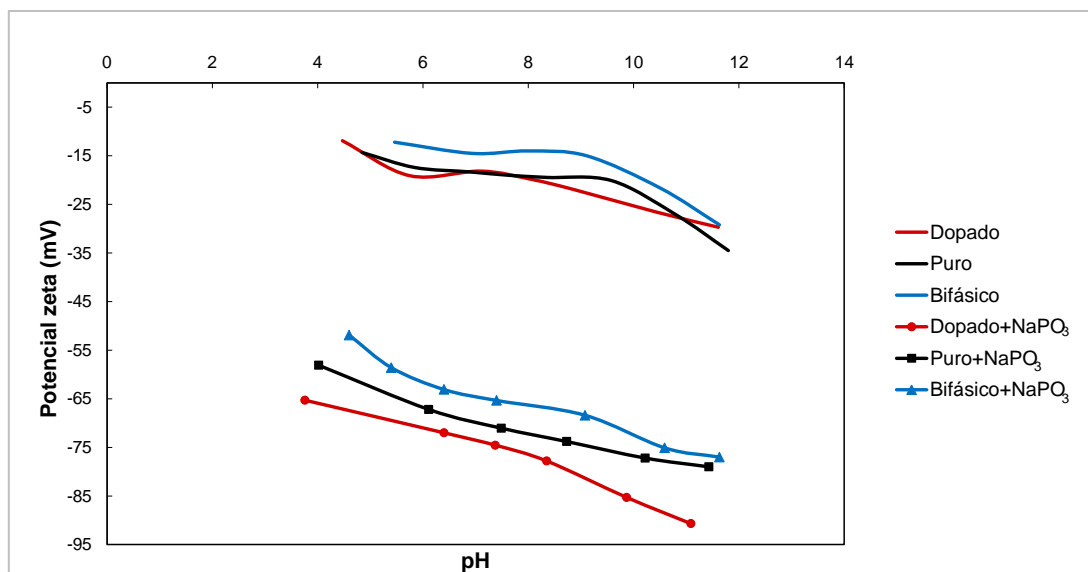


Figura 31: Medição do potencial zeta dos pós preparados sem e com polifosfato de sódio (NaPO_3).

As partículas com um elevado potencial zeta (negativo ou positivo) são electrostaticamente repulsivas e as forças de repulsão electrostáticas podem vencer as forças atractivas de Van der Waals, permitindo obter suspensões estáveis de pós bem desaglomerados. Contrariamente, quando os valores de potencial zeta são baixos, próximos do ponto isoeléctrico, as partículas têm tendência a aglomerar e/ou flocular sob a acção predominante das forças atractivas de Van der Waals.⁹⁸

Os resultados apresentados na Figura 31 revelam que o polifosfato de sódio confere à superfície das partículas valores de potencial zeta suficientemente negativos, o que se traduz numa boa eficácia na desfloculação das suspensões dos pós de fosfatos de cálcio. Ao pH natural das suspensões ($\text{pH} \approx 8$) os valores de potencial zeta variam aproximadamente entre 60–80 mV. Estes contrastam com os valores modestos medidos para os mesmos pós na ausência de dispersante. Assim, o polifosfato apresenta-se como um desfloculante promissor, para preparar suspensões com uma elevada fracção de sólidos.

4.2.2. Caracterização das Suspensões

Após a confirmação de que o polifosfato de sódio era um dispersante promissor, estudámos a quantidade necessária para atingir valores mínimos de viscosidades das suspensões. As Figuras 32, 33 e 34 apresentam a variação da viscosidade em função da velocidade de corte, para as suspensões à base de β -fosfato tricálcico puro, dopado, e

sistema bifásico, contendo 35% de volume de sólidos na presença de diferentes teores de polifosfato de sódio.

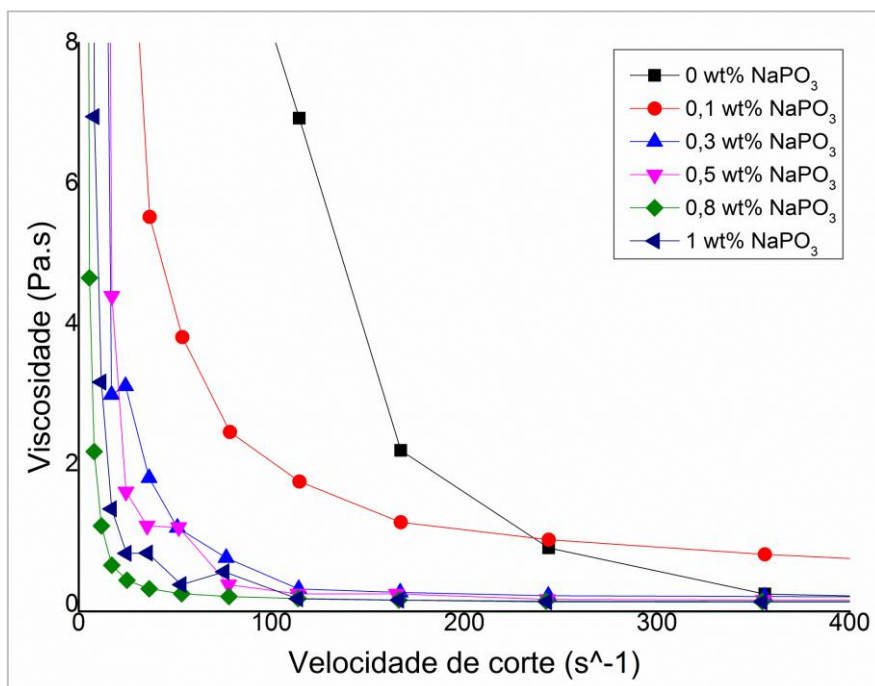


Figura 32: Curvas de fluxo de suspensões à base de β -TCP puro com concentrações de 35% de volume de sólidos, na presença de diferentes quantidades de polifosfato de sódio (NaPO_3), nomeadamente, com as percentagens em peso de 0, de 0,1, de 0,3, de 0,5, de 0,8 e de 1 wt%.

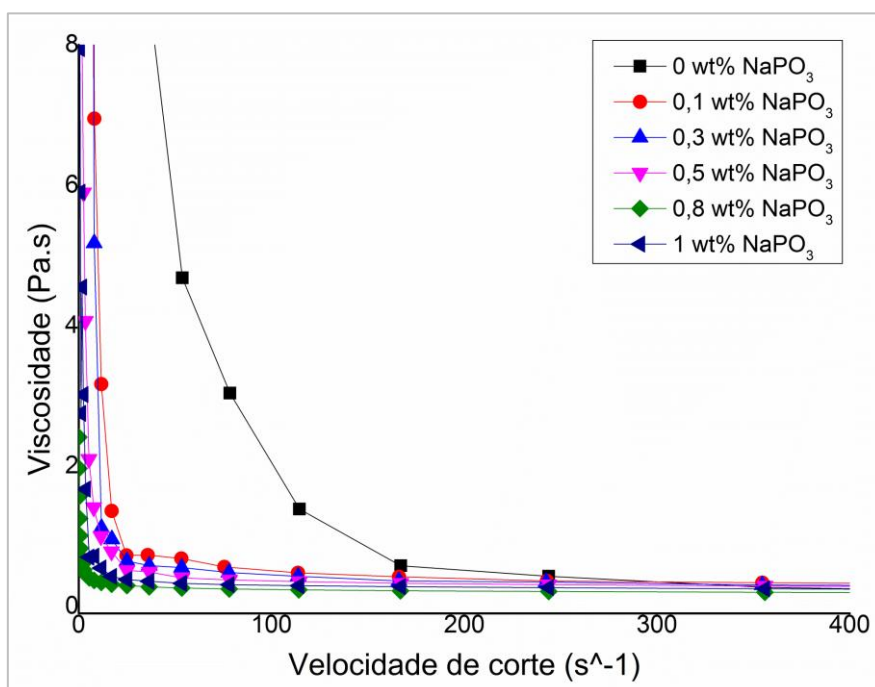


Figura 33: Curvas de fluxo de suspensões à base de β -TCP dopado com concentrações de 35% de volume de sólidos, na presença de diferentes quantidades de polifosfato de sódio (NaPO_3), nomeadamente, com as percentagens em peso de 0, de 0,1, de 0,3, de 0,5, de 0,8 e de 1 wt%.

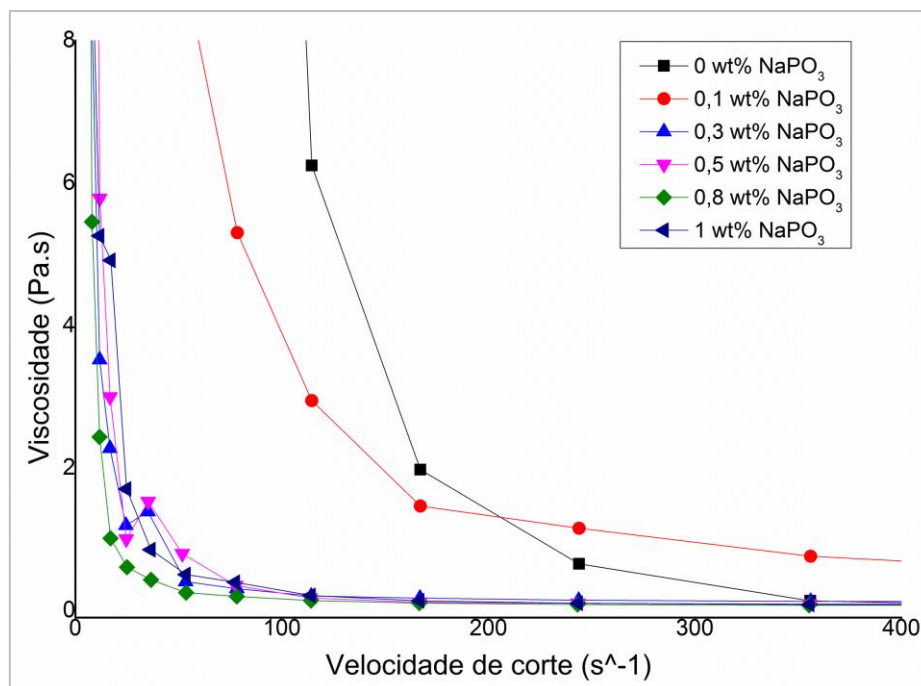


Figura 34: Curvas de fluxo de suspensões à base de fosfato de cálcio bifásico com concentrações de 35% de volume de sólidos, na presença de diferentes quantidades de polifosfato de sódio (NaPO₃), nomeadamente, com as percentagens em peso de 0, de 0,1, de 0,3, de 0,5, de 0,8 e de 1 wt%.

Os resultados obtidos demonstram que, para todas as composições de pós estudadas, o aumento gradual da concentração de polifosfato de sódio provoca diminuições acentuadas na viscosidade das suspensões. As variações mais drásticas de viscosidade observam-se logo com as primeiras adições de dispersante (0,1–0,3 wt%), seguidas de abaixamentos mais graduais. Os valores mínimos de viscosidade ocorreram na presença de 0,8 wt% de polifosfato de sódio, para todas as composições (Figuras 32, 33 e 34). No entanto, as viscosidades mais baixas foram obtidas para a composição dopada, seguida da composição bifásica e, por fim, da composição pura. As pequenas diferenças observadas podem dever-se à incorporação de iões estranhos na rede cristalina com tamanhos diferentes e às tensões mecânicas induzidas na rede, as quais podem determinar comportamentos distintos durante a moagem.^{2,99} Esta hipótese é suportada pelas diferentes distribuições de tamanho de partícula (Figura 26). Os pós da composição dopada e da composição bifásica apresentam distribuições mais alargadas, que permitem um melhor empacotamento das partículas, podendo as mais pequenas ocupar os espaços intersticiais entre as de maiores dimensões.⁹⁵

As Figuras 32, 33 e 34 mostram ainda que as suspensões apresentam comportamento reo-fluidificante, caracterizado por um abaixamento acentuado da

viscosidade à medida que a velocidade de corte aumenta.⁹⁵ Para teores de desfloculante $\geq 0,3$ wt%, o comportamento reo-fluidificante verifica-se especialmente na gama mais baixa de velocidades de corte até cerca de 100 s^{-1} . Esta fluidificação por escoamento torna as suspensões adequadas para o fabrico de grânulos, etapa que envolve a sua pulverização através de orifícios finos.

Determinada a quantidade de dispersante mais adequada (0,8 wt%), procedeu-se ao estudo do efeito da concentração de sólidos nas suspensões. Para todas as composições de pós, verificou-se uma esperada subida da viscosidade com o aumento da concentração de sólidos, sendo possível preparar suspensões com 50% de volume de sólidos. As curvas de fluxo das suspensões de β -TCP puro, β -TCP dopado, e mistura bifásica, com 50% de volume de sólidos na presença da quantidade óptima de dispersante estão apresentadas na Figura 35. Como se pode observar, todas as suspensões apresentaram um comportamento reo-fluidificante, ou seja, a viscosidade diminuiu com o aumento da velocidade de corte, característico de suspensões homogéneas e bem desfloculadas.⁹⁵

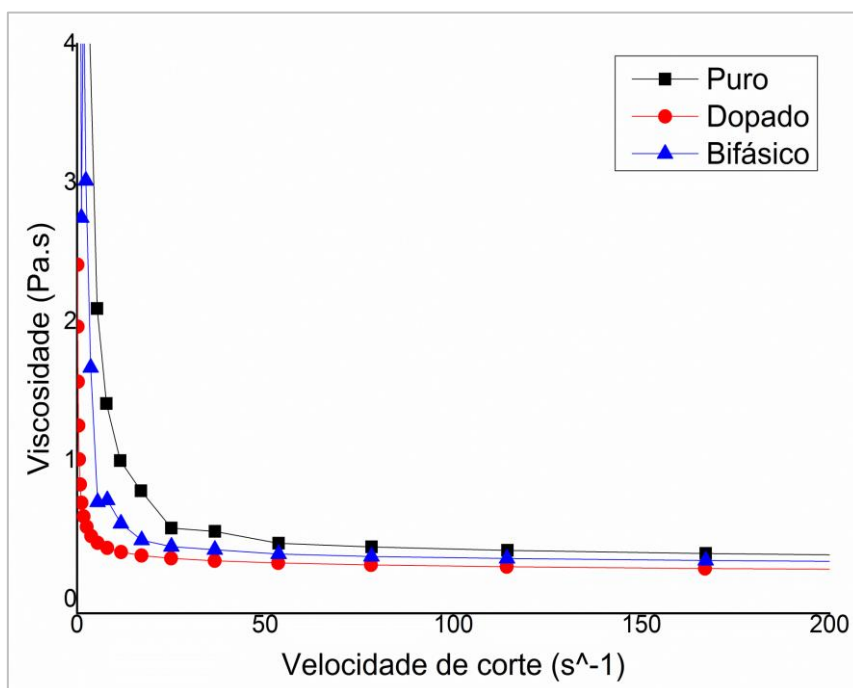


Figura 35: Curva de fluxo de suspensões à base de β -TCP puro, β -TCP dopado e mistura bifásica, com concentrações de 50% de volume de sólidos na presença de 0,8 wt% de polifosfato de sódio.

4.2.3. Caracterização morfológica dos grânulos

Os grânulos foram preparados pelo método de gelificação ionotrópica, partindo de suspensões concentradas e bem dispersas. Através da variação dos parâmetros no processo de gotejamento, tais como, o diâmetro do bico, o caudal da suspensão e a pressão de ar, foi possível controlar o diâmetro dos grânulos. Verificou-se que usando o mesmo diâmetro de bico de aspersão e uma pressão de ar fixa no processo de gotejamento, o aumento do caudal da suspensão provocava o aumento do tamanho dos grânulos. Partindo das condições de aspersão optimizadas, e para todas as composições de pós, obtiveram-se grânulos entre duas gamas de tamanhos, nomeadamente, grânulos pequenos ($\geq 0,5$ mm e ≤ 1 mm de diâmetro) e grânulos grandes (≥ 1 mm de diâmetro).

A porosidade nos *scaffolds* é um factor determinante para a eficiência de regeneração óssea, bem como para a incorporação e posterior libertação de fármacos. No caso de materiais de enxerto ósseo na forma granular, os poros de maiores dimensões para o crescimento do novo osso são determinados pelos espaços intergranulares. A porosidade intragranular deixada pelos interstícios entre as partículas primárias é a que desempenha um papel relevante na incorporação e posterior libertação de fármacos.⁴

Os equipamentos disponíveis no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica não permitem efectuar nenhum tipo de medição directa da porosidade apresentada pelos grânulos. Por isso usaram-se métodos indirectos para obter alguma informação relacionada com a porosidade. Um deles foi a determinação da capacidade de absorção de água que reflecte a fracção volúmica de poros. O outro foi através de observações por SEM da microestrutura interna e do grau de interconectividade dos poros. Este método foi também usado para revelar a morfologia exterior dos grânulos crus e sinterizados.

Após a imersão dos grânulos em água foi possível tecer considerações sobre a sua porosidade, como se pode observar na Figura 36. Os resultados demonstram que todos os grânulos possuem uma estrutura porosa capaz de absorver água e os valores de absorção são, aproximadamente, entre 52% e 65%. O registo da massa húmida dos grânulos pode ter sido influenciado, pela degradação visível do material em contacto com a água. Tal facto pode explicar as diferenças de absorção entre diferentes composições dos grânulos.

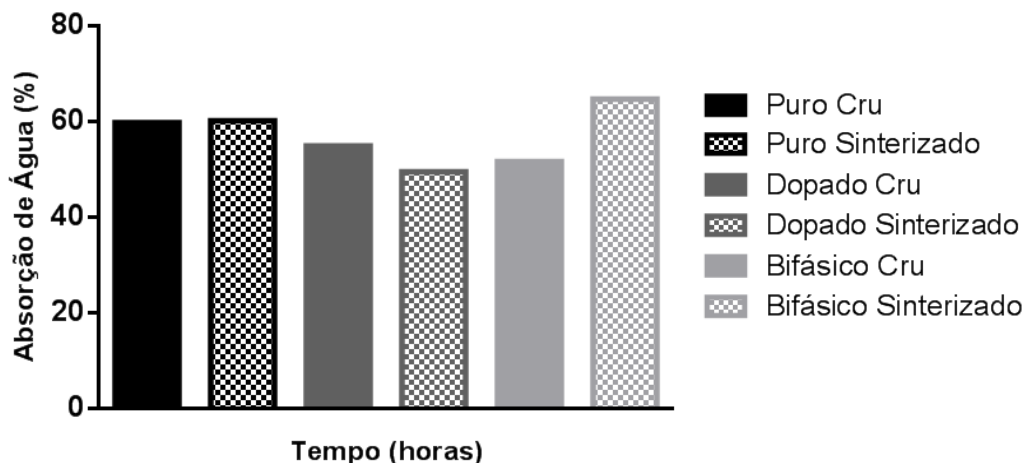


Figura 36: Capacidade de absorção (%) dos grânulos, após 2 horas em contacto com água.

As imagens SEM da Figura 37 mostram a morfologia exterior dos grânulos crus e sinterizados, preparados a partir das diferentes composições estudadas. Como se pode observar todos os grânulos apresentaram uma forma esférica com superfície porosa, independentemente do diâmetro. Através dos pormenores da morfologia exterior dos grânulos, demonstrados na Figura 38, é possível verificar algumas diferenças nos materiais sem e com tratamento térmico. Os grânulos crus apresentam estruturas menos permeáveis, certamente derivadas da gelificação do alginato de sódio na presença de iões Ca^{2+} . O processo de sinterização permite tornar os grânulos com uma estrutura porosa mais bem definida, comparativamente aos grânulos crus. Tal facto é devido, por um lado, à queima do alginato de sódio e, por outro, à ligeira densificação do material que ocorre até aos 900°C . Esta temperatura relativamente baixa não é suficiente para eliminar os poros, ocorrendo apenas reforço das ligações (colos) entre as partículas por difusão no estado sólido como se pode observar na Figura 38. Esta porosidade remanescente e a área superficial interna dos grânulos são de grande importância para as aplicações pretendidas incorporação e libertação controlada de fármacos.^{50,100}

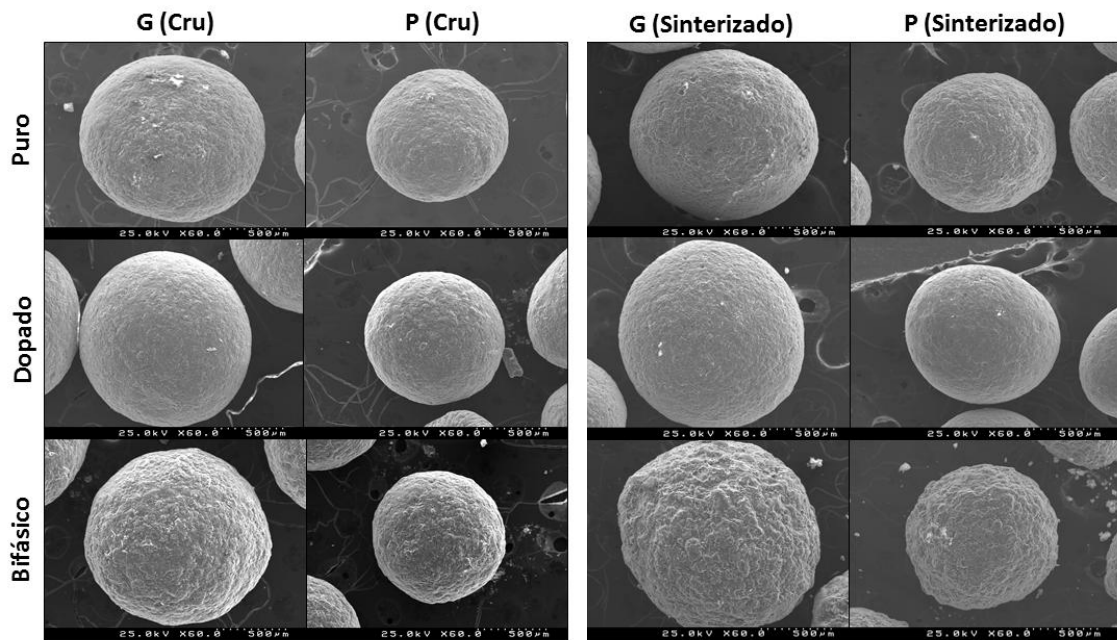


Figura 37: Micrografias de SEM do exterior dos grânulos crus e sinterizados das composições de β -TCP puro, β -TCP dopado e mistura bifásica, com diferentes diâmetros. G: grandes (≥ 1 mm); P: pequenos ($\geq 0,5$ mm e ≤ 1 mm).

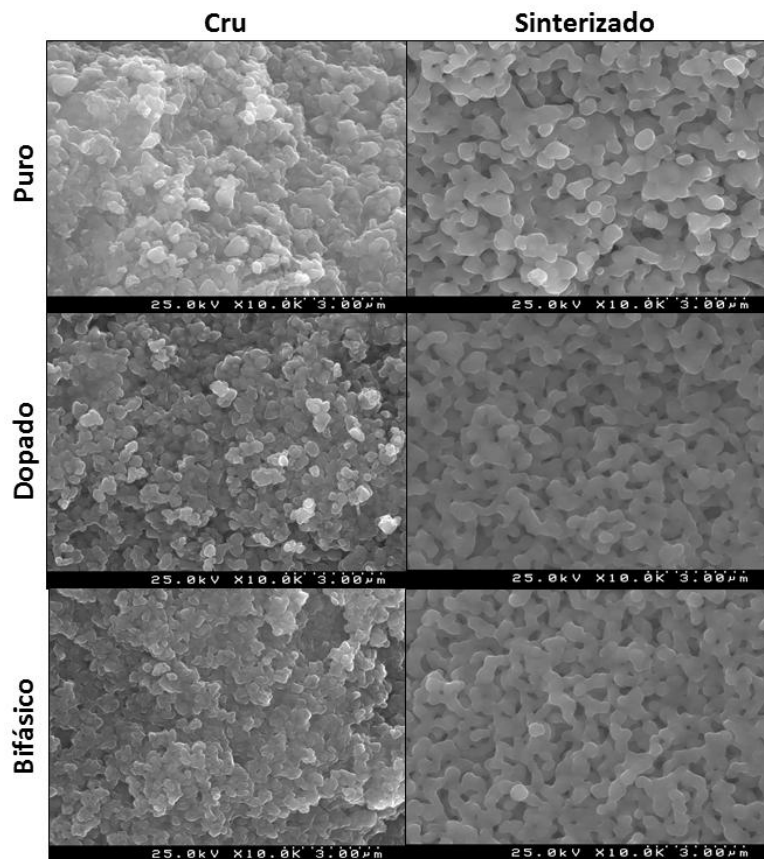


Figura 38: Micrografias de SEM revelando pormenores do exterior dos grânulos crus e sinterizados a 900°C , das diferentes composições de pós.

As micrografias de SEM apresentadas na Figura 39 mostram detalhes microestruturais internos dos diferentes grânulos. Como se pode observar, os grânulos de todas as composições possuem uma estrutura porosa no seu interior, que é semelhante à observada na sua superfície externa. Desse modo, pode inferir-se que o método da gelificação ionotrópica permite produzir materiais porosos com uma distribuição homogênea da porosidade em todo o seu volume.

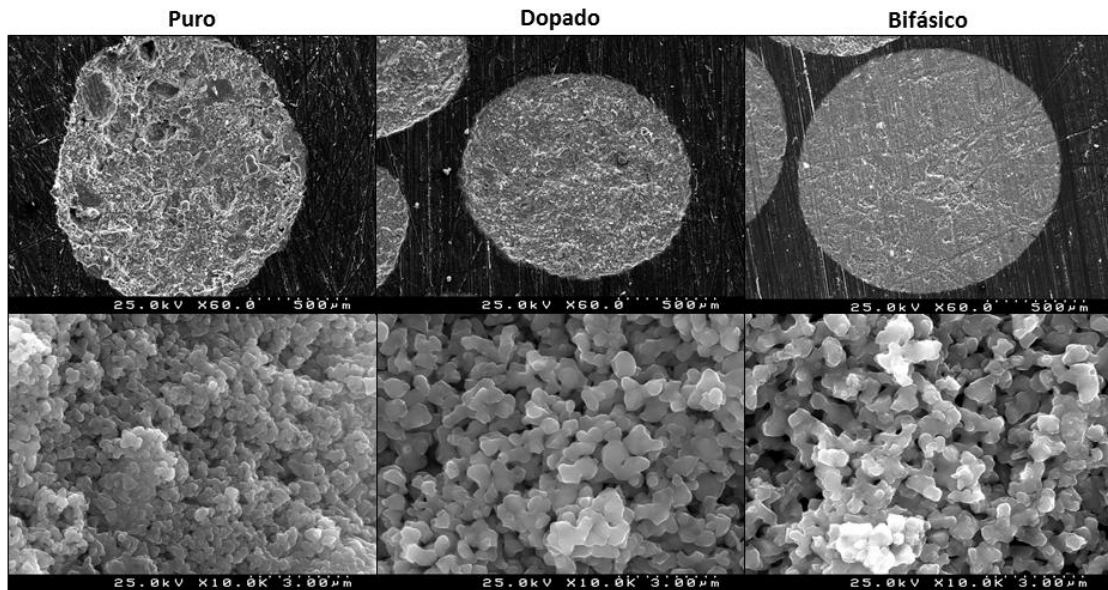


Figura 39: Micrografias de SEM revelando pormenores do interior dos grânulos sinterizados a 900°C, das diferentes composições de pós.

Segundo a literatura, um *scaffold* ideal para o tecido ósseo deve conter uma estrutura porosa interligada (>65%) com tamanhos de poros entre 10 µm e 500 µm de diâmetro, de forma a imitar as propriedades biomiméticas do tecido a regenerar e a potenciar a osteocondução.^{17,29} Os grânulos preparados são constituídos maioritariamente por microporos interligados (Figuras 37, 38 e 39), que lhes conferem capacidade para o armazenamento de moléculas terapêuticas. Enquanto espaços intergranulares desempenham o papel dos macroporos, para o crescimento do novo osso. Estas características intensificam os de fenómenos de migração e adesão celular que aceleram a ligação dos grânulos com o tecido circundante e indicam que os grânulos preparados são adequados às aplicações desejadas.^{26,101,102}

4.3. Estudos de Impregnação de Fármaco e Ensaio *in vitro*

Após a preparação dos grânulos pretendeu-se avaliar a sua multifuncionalidade, ou seja, a sua capacidade de regeneração celular e de libertação de fármacos. Para tal, realizaram-se estudos de biocompatibilidade *in vitro* em SBF, estudos de impregnação e de libertação de fármaco, e ensaios de actividade biológica em células derivadas de osteossarcoma humano (MNNG/HOS). Os grânulos bifásicos pequenos foram escolhidos, para o seguimento do trabalho. Os materiais bifásicos são usualmente seleccionados, para aplicações de regeneração óssea, devido à sua taxa de reabsorção. Esta pode ser controlada, de modo a obter um equilíbrio adequado entre a degradação do *scaffold* e a formação de novo tecido ósseo. O diâmetro pequeno foi escolhido, de modo a aumentar a área de contacto entre os fluídos celulares e os grânulos.^{2,5}

4.3.1. Biocompatibilidade *in vitro* dos Grânulos em SBF

A biocompatibilidade *in vitro* dos grânulos foi determinada, através do envelhecimento das amostras em SBF, que consiste numa solução com concentração iónica semelhante à do plasma sanguíneo humano.

Os resultados após a imersão dos grânulos bifásicos durante 24 horas, 7 dias, 14 dias e 28 dias encontram-se na Figura 40. Como se pode observar, ao longo do tempo a morfologia irregular dos grânulos torna-se mais uniforme, especialmente na superfície interna dos poros após 28 dias. A imersão dos grânulos em SBF proporcionou a ocorrência de reacções de dissolução e de precipitação na interface do material. À medida que aumentou a concentração dos iões de Ca^{2+} e de PO_4^{3-} devido às reacções de dissolução, atingiu-se um grau de saturação, induzindo a precipitação dos iões nas cavidades dos grânulos na forma de uma camada superficial apatítica. Tal facto contribuiu para uma certa uniformidade da estrutura porosa, confirmando a bioactividade destes materiais.^{5,88}

É de realçar que estes resultados são concordantes com o que acontece a nível molecular no corpo humano após a introdução de um material bioactivo. As reacções na interface conduziram à dissolução do material implantado, verificando-se a sua reabsorção simultânea com a formação de novo tecido.^{5,7}

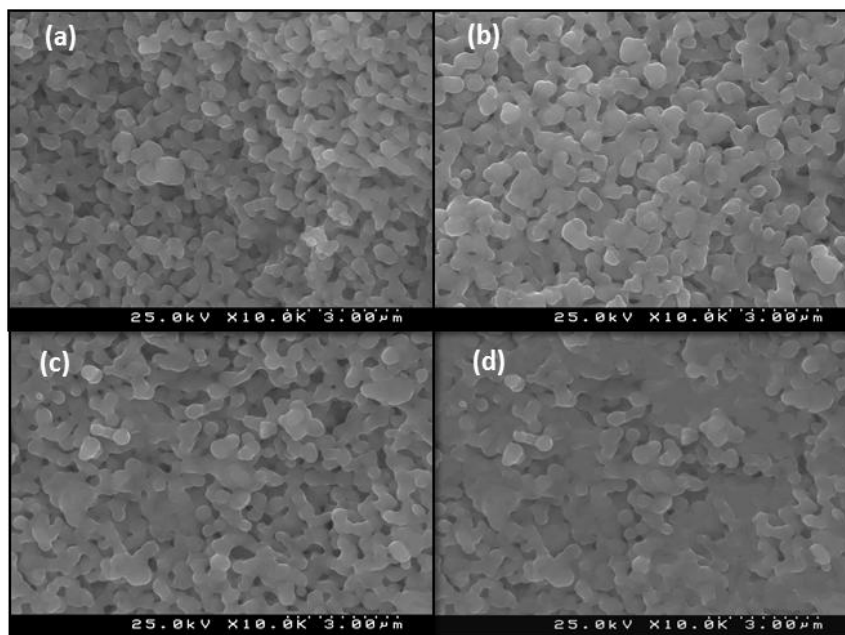


Figura 40: Micrografias SEM dos grânulos bifásico após imersão em SBF por períodos de tempo diferentes: 24 horas (a); 7 dias (b); 14 dias (c); 28 dias (d).

4.3.2. Estudos de Impregnação e Liberação de Doxorrubicina

O uso de grânulos de fosfato de cálcio como sistemas de liberação de fármacos tem sido estudado, devido à sua elevada biocompatibilidade, à previsibilidade da resposta terapêutica, à maior eficiência e segurança.² A doxorrubicina é um fármaco eficaz e amplamente usado no tratamento de cânceros, nomeadamente, de osteossarcomas.⁷⁷ Existe pouca informação disponível sobre sistemas à base de fosfatos de cálcio para a liberação de DOX, uma vez que só muito recentemente começaram a ser investigados.⁸³ Quanto ao uso de grânulos crus e sinterizados, e a sua eficiência na liberação de fármacos e actividade biológica, não existem ainda resultados reportados na literatura.

No presente trabalho, os grânulos preparados distinguem-se pelo tratamento térmico aplicado, mas também pela estratégia de incorporação de DOX usada. Os grânulos bifásicos crus com doxorrubicina (BCD) foram obtidos através da adição directa da DOX à suspensão do pó de fosfato de cálcio contendo o alginato de sódio, seguida da aspersão na solução de cloreto de cálcio. Os grânulos sinterizados foram impregnados com doxorrubicina (BSD), através da sua imersão numa solução de fármaco. A quantidade de fármaco incorporado/planeado nos grânulos sinterizados foi de 0,9 g de solução de DOX/g pó. Tendo em conta a quantidade limitada de fármaco

disponível, o nível de incorporação planeada nos grânulos crus teve de ser baixado para 0,5 g de solução de DOX/g pó.

Para estudar a eficácia da incorporação de doxorubicina nos grânulos bifásicos porosos, procedeu-se à sua digestão completa em HCl durante 24 horas e determinaram-se as concentrações de DOX presentes nas soluções resultantes, como se pode observar pela Tabela 10. Para o efeito, traçaram-se curvas de calibração com recurso a soluções com várias concentrações de DOX em HCl.

Tabela 10: Incorporação de DOX por digestão completa dos grânulos bifásicos, durante 24 horas em HCl. Os dados correspondem à média e desvio padrão de três ensaios independentes realizados em triplicado. Os dados foram obtidos por fluorescência com excitação 470 nm e emissão 580 nm. O processamento dos dados foi realizado no *software Origin 9.0*, que permitiu estabelecer a curva de melhor ajuste aos resultados experimentais e determinar a concentração de DOX impregnada nos grânulos.

Nomenclatura	Média (mg DOX/g de grânulos)	SD
BCD	30,24	10,09
BSD	921,23	219,24

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam, que as concentrações (em mg DOX/g grânulos) variaram entre $30,2 \pm 10,1$ para os grânulos crus e $921,2 \pm 219,2$ para os grânulos sinterizados, verificou-se portanto, uma diferença estatisticamente significativa na incorporação de DOX pelos dois tipos de grânulos ($p < 0,001$). A quantidade de fármaco incorporada nos grânulos sinterizados foi aproximadamente 30 vezes superior à determinada para os grânulos crus.

Segundo Marques *et al.* (2015), a estrutura dos potenciais sistemas de libertação de fármacos deve ser controlada, em termos de porosidade e de tamanho de poros.² A presença de uma estrutura microporosa interligada proporciona uma área superficial específica maior para a adsorção. Este aumento da área superficial contribui para o eficiente aprisionamento de fármacos e sua posterior libertação; fornece ainda espaço suficiente para o fornecimento de nutrientes e crescimento de novo tecido ósseo.^{101,102}

Deste ponto de vista, e considerando que a sinterização contribui para a diminuição da porosidade e o aumento da densidade do material,⁵⁰ os grânulos crus

deveriam ser capazes de incorporar mais fármaco em comparação com os grânulos sinterizados a 900°C. Contudo, os sítios activos para a adsorção na superfície das partículas dispersas na solução do dispersante podem já estar relativamente saturados com as espécies iónicas do dispersante e ficaram assim menos disponíveis para adsorver a DOX. Por outro lado, importa realçar que a quantidade de fármaco adicionada aos grânulos crus foi inferior pelas seguintes razões: (i) insuficiente disponibilidade de fármaco (0,5 g DOX/g pó para os grânulos crus e 0,9 g DOX/g pó para os grânulos sinterizados); (ii) parte do fármaco adicionado à suspensão não ficou nos grânulos crus, mas difundiu-se para a solução de cloreto de cálcio após a aspersão, como se podia inferir através da coloração cor-de-rosa que apresentava (mais desmaiada do que a cor da solução de DOX original). De qualquer modo, não se esperava uma diferença tão grande entre os valores de concentração de DOX planeados e realmente retidos. Assim, a estratégia de incorporação do fármaco em grânulos crus deverá ser melhor estudada, de modo a determinar a quantidade mínima necessária de DOX na suspensão, para obter o mesmo nível de incorporação nos grânulos sinterizados.

A libertação de DOX pelos grânulos bifásicos foi estudada ao longo de diferentes tempos de incubação em solução salina de tampão fosfato (PBS). Para determinar as concentrações de DOX libertadas foi necessário traçar curvas de calibração do fármaco para cada ensaio, que se ajustaram ao modelo exponencial. A Figura 41 apresenta os perfis de libertação de DOX a partir dos grânulos após 2, 6, 24 e 48 horas. Podemos observar que os grânulos crus apresentam um perfil de libertação crescente, com o aumento dos tempos pré-determinados para os testes. As concentrações (em mg de DOX/g grânulos) variaram entre cerca de $8 \pm 1,9$ após 2 horas de incubação, aumentando para $9,6 \pm 1,0$ após 6 horas de incubação, para $10,6 \pm 1,6$ após 24 horas de incubação e para $20,2 \pm 10,3$ após 48 horas de incubação. De facto, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa entre as 2 horas e as 48 horas de libertação de DOX ($p < 0,05$). Em contraste, a libertação a partir dos grânulos sinterizados foi mais repentina, com um *burst* inicial de cerca de $320 \pm 11,6$ mg DOX/g grânulos ao fim de 2 horas, tendo uma concentração semelhante ao fim de 6 horas ($317 \pm 7,2$ mg DOX/g grânulos). Estranhamente, a quantidade medida após tempos de imersão mais longos diminuiu gradualmente, para cerca de

275,7±26,7mg DOX/g grânulos (24 horas) e 258,7±9,5mg DOX/g grânulos (48 horas). A tendência decrescente observada para os grânulos sinterizados sugere a possibilidade da DOX sofrer alguma degradação depois de libertada para a solução de PBS.² Este assunto merece ser melhor investigado no futuro. No caso dos grânulos sinterizados não se verificaram significâncias estatísticas entre os tempos de incubação estudados. Por outro lado, a liberação de DOX pelos grânulos sinterizados foi significativamente superior ($p < 0,01$) em comparação aos grânulos crus.

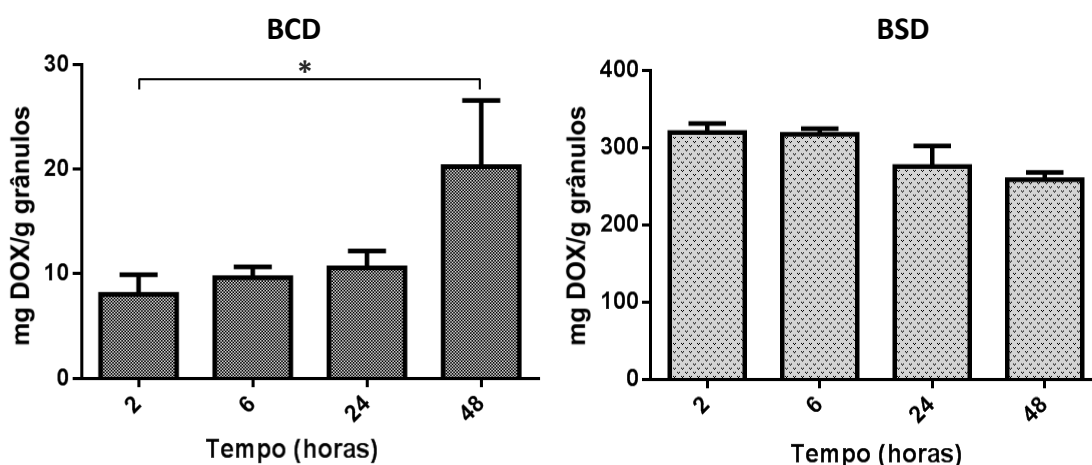


Figura 41: Liberação de doxorubicina a partir dos grânulos bifásicos em PBS, após 2, 6, 24 e 48 horas. Os pontos correspondem à média e desvio padrão de dois ensaios independentes realizados em triplicado. Os dados foram obtidos por fluorescência com excitação 470 nm e emissão 580 nm. O processamento dos dados foi realizado no *software Origin 9.0*, que permitiu estabelecer a curva de melhor ajuste aos resultados experimentais e determinar a concentração de DOX libertada pelos grânulos. As diferenças significativas estão representadas com * que significa $p < 0,05$.

Os menores níveis de liberação iniciais medidos para os grânulos crus (BCD), cerca de 40 vezes inferiores aos determinados para os grânulos sinterizados (BSD), e a tendência crescente ao longo do tempo de imersão sugerem que a presença de alginato de sódio nos grânulos crus condiciona a liberação de DOX. Postula-se a hipótese de a gelificação do alginato de sódio poder tornar os grânulos crus menos permeáveis, justificando assim uma taxa de liberação mais lenta do fármaco. É de realçar, que o alginato de sódio é um polímero natural biodegradável e não tóxico, sendo maioritariamente usado para sistemas de liberação de fármacos como um revestimento, devido à sua capacidade de reduzir a permeabilidade dos revestimentos, proporcionando assim uma liberação dos fármacos mais controlada e prolongada.^{103,104} A maior área específica dos pós não sinterizados e a menor quantidade de fármaco

incorporado também deverão contribuir, para a libertação mais lenta a partir dos grânulos crus.⁵⁰

A eliminação do alginato de sódio por queima a 900°C anula a sua acção retentiva nos grânulos sinterizados, explicando porque é que estes apresentam uma libertação mais rápida do fármaco. O estudo da funcionalização prévia da superfície como, por exemplo, o uso de materiais capazes de revestir os grânulos, com o intuito de controlar a cinética de libertação de DOX é fulcral para a realização de próximos trabalhos.^{103,104}

4.3.3. Ensaio de Actividade Biológica Usando Linhas Celulares Derivadas de Osteossarcoma Humano (MNNG/HOS)

Os grânulos bifásicos foram condicionados previamente em meio de cultura e a sua citotoxicidade em relação à linha celular humana de osteossarcoma MNNG/HOS foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT. As concentrações de meio condicionado, obtidas por diluição, foram as seguintes: 100%, 50%, 25%, 12%, 6% e 3%. Com os resultados obtidos no ensaio colorimétrico de MTT, foram traçadas curvas de dose-resposta da percentagem de actividade metabólica em função do logaritmo da concentração do meio condicionado, como se pode observar na Figura 42. A citotoxicidade foi determinada tendo em consideração o valor de concentração do meio condicionado, que inibe a proliferação celular em 50% (IC_{50}). Os valores de IC_{50} e os respectivos intervalos de confiança a 95% e erro padrão estão apresentados na Tabela II.

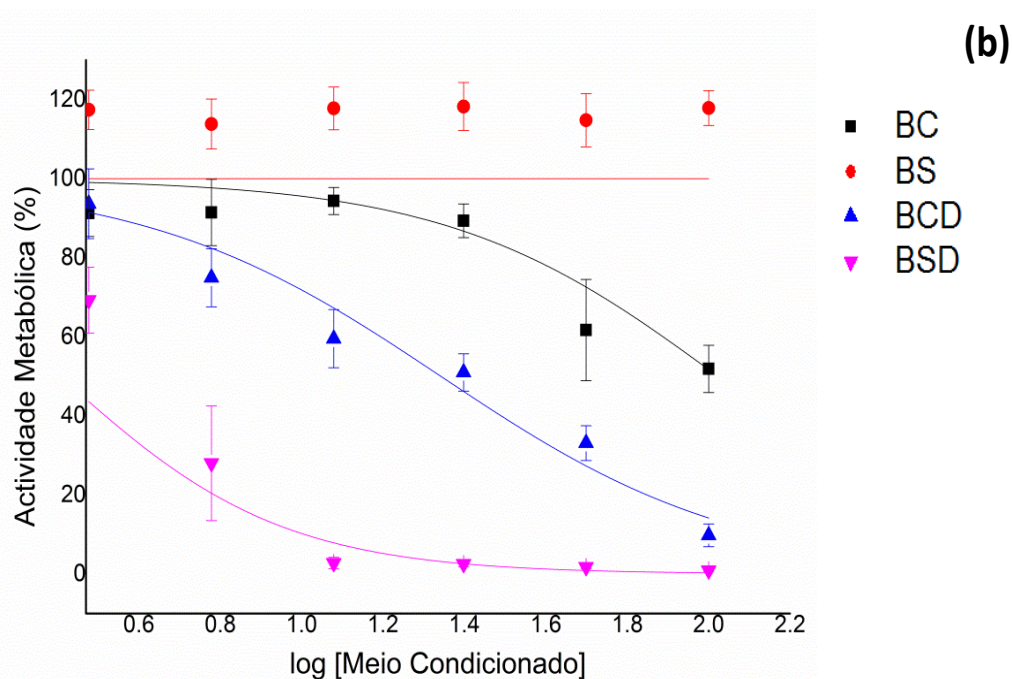
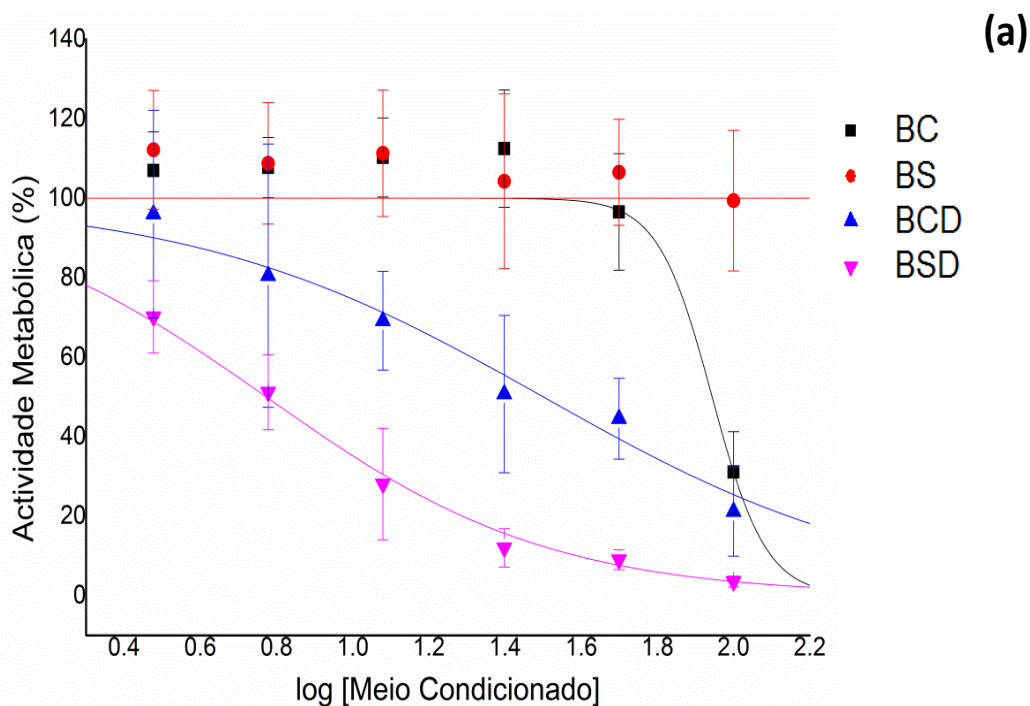


Figura 42: Actividade metabólica (%) dos grânulos bifásicos, para as diferentes concentrações de meio condicionado, durante 48 horas (a) e 96 horas (b). Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de quatro ensaios independentes realizados em triplicado. As curvas de dose-resposta foram desenhadas no *software Origin 9.0*, que através do processamento dos resultados obtidos estabeleceu a curva de melhor ajuste a uma função sigmóide e forneceu a equação das mesmas.

Tabela 11: Efeitos citotóxicos do meio condicionado na linha celular MNNG-HOS, durante 48 e 96 horas de exposição. O IC₅₀ e os respectivos intervalos de confiança a 95% e erro padrão foram calculados, a partir do ajuste das curvas de dose-resposta a uma função sigmóide.

Nomenclatura	MTT 48 horas			MTT 96 horas		
	IC50 (%)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança (95%)	IC50 (%)	Erro padrão	Intervalo de Confiança (95%)
BC	87,81	13,08	[52,2; 147,8]	105,43	17,73	[58,6; 189,8]
BS*		*			*	
BCD	31,63	3,50	[21,5; 46,6]	21,99	3,18	[13,3; 36,5]
BSD	5,93	0,58	[4,5; 7,8]	2,55	1,37	[0,6; 11,3]

BS*: Nos grânulos bifásicos sem doxorubicina não foi possível efectuar o ajuste da curva de dose-resposta a uma função sigmóide, uma vez que não há inibição da proliferação celular.

Segundo os resultados obtidos, a viabilidade da cultura celular foi significativamente reduzida após o tratamento de meio condicionado incubado com BSD, comparativamente ao tratamento com BCD (Figura 42). Para estes grânulos, a diminuição da viabilidade celular foi mais acentuada 96 horas após o tratamento ($p=0,014$), do que para as 48 horas ($p=0,05$). Também é possível observar que à medida que a concentração de meio condicionado aumenta, maior é a redução da proliferação celular (Figura 42). O valor médio de IC₅₀ nos BSD foi de $5,93 \pm 0,58\%$ para as 48 horas e $2,55 \pm 1,37\%$ para as 96 horas, sendo inferior ao IC₅₀ calculado para os BCD ($31,63 \pm 3,50\%$ para as 48 horas e $21,99 \pm 3,18\%$ para as 96 horas) (Tabela 11). Como anteriormente estudado, o perfil de libertação de DOX nos BSD é mais rápido, do que nos BCD. No entanto, existe uma incorporação de fármaco 30 vezes superior nos BSD. Desse modo, os resultados de citotoxicidade obtidos estão em concordância com os estudos anteriores, uma vez que seria de esperar que as curvas de dose-resposta dos BSD exibissem uma maior redução da viabilidade celular.

Quanto aos grânulos bifásicos sem DOX, esperava-se que as curvas de dose-resposta não exibissem nenhum efeito citotóxico. Os grânulos sinterizados (BS) comprovam esta condição, como se pode observar pela Figura 42 e pela Tabela 11. Contrariamente, os grânulos crus (BC) demonstram uma inibição da viabilidade celular. Embora a concentração requerida, para inibir a proliferação celular em 50% tenha sido superior (IC₅₀= $87,81 \pm 13,08\%$ para as 48 horas; IC₅₀= $105,43 \pm 17,73\%$ para as 96 horas), em comparação com os grânulos bifásicos com DOX (Figura 42 e Tabela 11).

É de realçar que se verificou uma redução significativa da viabilidade das células após o tratamento com BCD, relativamente ao tratamento com BC ($p < 0,001$ para as

48 horas e $p=0,013$ para as 96 horas). Assim sendo, o efeito da citotoxicidade dos BCD pode ser influenciado, não só pela sua reduzida capacidade de impregnação de fármaco, mas também pela presença de componentes orgânicos usados no seu processo de produção. A interacção molecular e iónica entre o material e o ambiente aquoso pode traduzir-se na libertação de certas espécies iónicas, que resultam na modificação do pH do meio. Esta alteração de pH pode ser determinante para a entrega de doxorubicina às células tumorais.⁸⁰ Contudo, este assunto merece ser melhor estudado no futuro.

Além disso, verificou-se que os grânulos preparados (BC, BCD e BSD) não apresentaram um aumento significativo da inibição da actividade metabólica celular ao longo do tempo de avaliação (48 e 96 horas).

Assim, a estratégia de incorporação de DOX em grânulos crus e sinterizados deverá ser melhor estudada, bem como o estudo da funcionalização prévia da superfície, de modo a controlar a cinética de libertação de DOX e potenciar o seu efeito citotóxico nas células da linha celular humana de osteossarcoma MNNG/HOS.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusão

O presente trabalho teve como objectivo principal o desenvolvimento de substitutos ósseos à base de fosfatos de cálcio, na forma de grânulos porosos multifuncionais, com capacidade de regeneração e de libertação de fármacos *in situ*. Para o atingir, foi necessário cumprir com sucesso as várias etapas previstas no programa de trabalhos e que incluíram: (i) a síntese dos pós e o seu processamento com vista à preparação das suspensões usadas no fabrico dos grânulos; (ii) a produção e caracterização dos grânulos; (iii) a impregnação dos grânulos com o fármaco seleccionado (DOX); (iv) e os testes *in vitro*.

Para a dispersão dos pós seleccionou-se o polifosfato de sódio como dispersante por ser não tóxico, já que uma das estratégias testadas envolveu o uso de grânulos crus. Todos os pós puderam ser facilmente dispersos na presença de 0,8 wt% de dispersante, de modo a obter suspensões com 50% de volume de sólidos, e com um comportamento reológico adequado à aspersão das suspensões contendo alginato de sódio, na solução do agente gelificante. Foi possível controlar o diâmetro médio dos grânulos através do ajuste adequado dos parâmetros no processo de gotejamento.

Com vista a alcançar o objectivo principal (grânulos reabsorvíveis e multifuncionais pensados para aplicações em regeneração óssea, e com capacidade de libertação controlada de fármacos), seleccionou-se a composição bifásica e adoptaram-se duas estratégias diferentes para a incorporação do fármaco.

A primeira estratégia consistiu na incorporação de DOX, após o tratamento térmico dos grânulos a 900°C durante 1 hora. Para o efeito, os grânulos sinterizados foram imersos numa solução de DOX com 0,9 g DOX/g pó. A segunda estratégia residiu durante o processo de fabrico dos grânulos. Neste caso, e tendo em conta a limitada quantidade de fármaco disponível, teve de se diminuir a quantidade incorporada/planeada do fármaco para 0,5 g DOX/g. Verificou-se que a primeira estratégia mencionada foi a mais eficiente, já que a concentração de DOX incorporada nos grânulos sinterizados foi significativamente superior (com um teor de DOX 30 vezes superior) à determinada para os grânulos crus. O perfil de libertação do fármaco a partir dos grânulos sinterizados também foi significativamente superior em comparação aos grânulos crus.

Os ensaios de actividade biológica usando células da linha celular derivada de osteossarcoma humano (MNNG/HOS) verificou-se que (i) na ausência do fármaco, os grânulos sinterizados não exibiram qualquer efeito citotóxico, como era de esperar. Contudo, os grânulos crus demonstram uma ligeira inibição da viabilidade celular, a qual foi atribuída à presença dos aditivos de processamento, nomeadamente, do alginato de sódio. (ii) Na presença de fármaco, os grânulos exibiram efeitos citotóxicos esperados, destacando-se os grânulos sinterizados. A viabilidade celular foi significativamente reduzida após o tratamento com os grânulos sinterizados em comparação com o que foi observado no caso do tratamento com grânulos crus. Assim, o efeito da citotoxicidade dos grânulos crus pode ser influenciado, não só pela sua menor capacidade de incorporação do fármaco, mas também pela presença dos aditivos de processamento. A eliminação do alginato de sódio por sinterização a 900°C deixa uma estrutura mais permeável, capaz de incorporar um teor de DOX mais elevado e, ao mesmo tempo, anula a sua acção retentiva, permitindo uma libertação mais rápida do fármaco que potencia o seu efeito citotóxico na linha celular.

O balanço global dos resultados obtido no âmbito deste trabalho permitem concluir, que os grânulos produzidos possuem características promissoras, para aplicações em regeneração do tecido ósseo e libertação controlada de fármacos. Estas potenciais multifuncionalidades precisam de ser comprovadas, através de estudos adicionais *in vitro* e *in vivo*.

5.2. Trabalhos Futuros

Os resultados do presente trabalho aparentam ser promitentes e justificam a realização de trabalhos de investigação futuros para averiguar melhor o seu desempenho *in vitro* na presença de vários tipos de células relevantes para a engenharia de tecidos, e de estudos *in vivo* para comprovar a sua eficácia. Os estudos não deverão restringir-se apenas aos grânulos porosos da composição bifásica, mas também aos das restantes composições preparadas (β -TCP puro e β -TCP dopado). Isso permitirá avaliar os efeitos não só da composição de fases cristalinas, mas também dos iões dopantes na regeneração óssea. A execução de testes de degradação e bioactividade *in vitro* e *in vivo* é fulcral, de forma avaliar o comportamento do material em contacto

com as células não tumorais e os fluidos corporais, de modo a escolher o material mais promissor para a regeneração do tecido ósseo.

Constitui uma perspectiva futura desenvolver a estratégia de incorporação de DOX no material mais promissor. Para tal, nos grânulos crus é necessário determinar a quantidade mínima necessária de DOX na suspensão, para obter o mesmo nível de incorporação usado nos grânulos sinterizados. A avaliação do tipo de ligação entre o fármaco e o material e o estudo da funcionalização prévia da superfície deverão ser realizados, de modo a controlar a adesão da DOX às partículas e a cinética de libertação. A realização de testes *in vitro* com linhas celulares derivadas de osteossarcomas humanos e testes *in vivo* em modelos animais, irá permitir avaliar o comportamento do material escolhido e perceber se atua também como um sistema de libertação de fármacos *in situ*, apresentando assim as características multifuncionais pretendidas.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFIA

6.1. Bibliografia

- (1) Navarro, M.; Michiardi, A.; Castano, O.; Planell, J. . Biomaterials in Orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* **2008**, *5* (27), 1137–1158.
- (2) Marques, C. F.; Lemos, A.; Vieira, S. I.; Da Cruz E Silva, O. A. B.; Bettencourt, A.; Ferreira, J. M. F. Antibiotic-Loaded Sr-Doped Porous Calcium Phosphate Granules as Multifunctional Bone Grafts. *Ceram. Int.* **2016**, *42* (2), 2706–2716.
- (3) Hong, M.; Kim, S.; Han, M.; Hyuk, Y.; Lee, Y.; Oh, D. S. Evaluation of Microstructure Effect of the Porous Spherical β -Tricalcium Phosphate Granules on Cellular Responses. *Ceram. Int.* **2014**, *40* (4), 6095–6102.
- (4) Denry, I.; Kuhn, L. T. Design and Characterization of Calcium Phosphate Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Dent. Mater.* **2016**, *32* (1), 43–53.
- (5) Habraken, W.; Habibovic, P.; Epple, M.; Bohner, M. Calcium Phosphates in Biomedical Applications: Materials for the Future? *Mater. Today* **2016**, *19* (2), 69–87.
- (6) Kim, D. H.; Chun, H. H.; Lee, J. D.; Yoon, S. Y. Evaluation of Phase Transformation Behavior in Biphasic Calcium Phosphate with Controlled Spherical Micro-Granule Architecture. *Ceram. Int.* **2014**, *40* (4), 5145–5155.
- (7) Verron, E.; Bouler, J. M.; Guicheux, J. Acta Biomaterialia Controlling the Biological Function of Calcium Phosphate Bone Substitutes with Drugs. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (10), 3541–3551.
- (8) Ben-nissan, B. *Advances in Calcium Phosphate Biomaterials*; Springer, **2014**; Vol. 2.
- (9) Vallet-regí, M. Evolution of Bioceramics within the Field of Biomaterials. *Comptes Rendus Chimie.* **2010**, *13*, 174–185.
- (10) Tate, P. Seeley's Principles of Anatomy and Physiology. *Connect Learn Succeed* **2012**.
- (11) Cooper, G. M.; Mooney, M. P.; Gosain, A. K.; Phil, G.; Losee, J. E.; Huard, J. NIH Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). *Plastic Reconstruction Surgery.* **2011**, *125* (6), 1685–1692.
- (12) Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia Basica*, 10^a.; Guanabara Koogan, **2004**.

- (13) LeGeros, R.; Daculsi, G.; LeGeros, J. Bioactive Bioceramics. *W Pietrzak, Ed. Musculoskelet. Tissue Regen. Humana Press* **2008**, 153–181.
- (14) Jones, J. R.; Hench, L. L. Regeneration of Trabecular Bone Using Porous Ceramics. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2003**, 7, 301–307.
- (15) Completo, A.; Fonseca, F. *Fundamentos de Biomecânica Músculo-Esquelética E Ortopédica*; Publindústria, **2011**.
- (16) Johnson, A. J. W.; Herschler, B. A. Acta Biomaterialia A Review of the Mechanical Behavior of CaP and CaP / Polymer Composites for Applications in Bone Replacement and Repair. *Acta Biomater.* **2011**, 7 (1), 16–30.
- (17) Gerhardt, L.; Boccaccini, A. R. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials.* **2010**, 3867–3910.
- (18) Currey, J. D. Tensile Yield in Compact Bone Is Determined by Strain , Post-Yield Behaviour by Mineral Content. *Journal of Biomechanics.* **2004**, 37, 549–556.
- (19) Moroni, L.; de Wijn, J. R.; van Blitterswijk, C. A. Integrating Novel Technologies to Fabricate Smart Scaffolds. *J. Biomaterials Science, Polymer Edition.* 2008; Vol. 19.
- (20) Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC Med.* **2011**, 9 (16), 1–10.
- (21) Bose, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A. Recent Advances in Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Trends Biotechnol.* **2012**, 30 (10), 546–554.
- (22) Matsuno, T.; Omata, K.; Hashimoto, Y.; Tabata, Y.; Satoh, T. Alveolar Bone Tissue Engineering Using Composite Scaffolds for Drug Delivery. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **2010**, 46 (2), 188–192.
- (23) Mistry, A. S.; Mikos, A. G. Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2005**, 94, 1–22.
- (24) Wu, C.; Chang, J.; Xiao, Y. *Advanced Bioactive Inorganic Materials for Bone Regeneration and Drug Delivery*; **2013**.
- (25) Salgado, A. J.; Coutinho, O. P.; Reis, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4 (8), 743–765.
- (26) Holzapfel, B. M.; Reichert, J. C.; Schantz, J.-T.; Gbureck, U.; Rackwitz, L.; Nöth, U.; Jakob, F.; Rudert, M.; Groll, J.; Hutmacher, D. W. How Smart Do Biomaterials Need to Be? A Translational Science and Clinical Point of View. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65 (4), 581–603.
- (27) Bilezikian, J. P.; Raisz, L. G.; Martin, T. J. *Principles of Bone Biology*, 3^a; Academic

- Press, **2008**.
- (28) Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5474–5491.
- (29) Gonc, L.; Crippa, G. E.; Oliveira, P. T. De. Pore Size Regulates Cell and Tissue Interactions with PLGA – CaP Scaffolds Used for Bone Engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2012**, 155–162.
- (30) Hench, L.; Polak, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. *Science*. **2002**, *295*, 1014–1017.
- (31) Dubok, V. A. Bioceramics: Yesterday, Today, Tomorrow. *Powder Metall. Met. Ceram.* **2000**, *39*, 381–393.
- (32) Šupová, M. Substituted Hydroxyapatites for Biomedical Applications : A Review. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 9203–9231.
- (33) Mondal, S.; Pal, U.; Dey, A. Natural Origin Hydroxyapatite Scaffold as Potential Bone Tissue Engineering Substitute. *Ceram. Int.* **2016**.
- (34) Verron, E.; Khairoun, I.; Guicheux, J.; Bouler, J. Calcium Phosphate Biomaterials as Bone Drug Delivery Systems : A Review. *Drug Discov. Today* **2010**, *15* (13–14), 547–552.
- (35) Dorozhkin, S. V; Epple, M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Drug Discov. Today* **2002**, *15*, 547–552.
- (36) Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Frederick, F. J.; Lemons, J. E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2^a; Academic Press, **2004**.
- (37) Baig, A. A.; Fox, J. L.; Wang, Z.; Higuchi, W. I.; Miller, S. C.; Barry, A. M.; Otsuka, M. Metastable Equilibrium Solubility Behavior of Bone Mineral. *Calcif. Tissue Int.* **1999**, *64*, 329–339.
- (38) Thamaraiselvi, T. V.; Rajeswari, S. Biological Evaluation of Bioceramic Materials - a Review. *Trends Biomater. Artif. Organs* **2004**, *18*, 9–17.
- (39) Kolmas, J.; Krukowski, S.; Laskus, A.; Jurkitewicz, M. Synthetic Hydroxyapatite in Pharmaceutical Applications. *Ceram. Int.* **2016**, *42* (2), 2472–2487.
- (40) Oliveira, I. R.; Andrade, T. L.; Araujo, K. C. M. L.; Luz, A. P.; Pandolfelli, V. C. Hydroxyapatite Synthesis and the Benefits of Its Blend with Calcium Aluminate Cement. *Ceram. Int.* **2016**, *42* (2), 2542–2549.
- (41) Marques, C. F.; Matos, A. C.; Ribeiro, I. A. C.; Gonçalves, L. M.; Bettencourt, A.; Ferreira, J. M. F. Insights on the Properties of Levofloxacin-Adsorbed Sr- and Mg-

- Doped Calcium Phosphate Powders. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, 27 (123).
- (42) Kannan, S.; Pina, S.; Ferreira, J. M. F. Formation of Strontium-Stabilized β -Tricalcium Phosphate from Calcium-Deficient Apatite. *J. Am. Ceram. Soc.* **2006**, 3280 (21705), 3277–3280.
- (43) Carrodeguas, R. G.; Aza, S. De. Acta Biomaterialia α -Tricalcium Phosphate: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2011**, 7 (10), 3536–3546.
- (44) Kannan, S.; Goetz-Neunhoeffler, F.; Neubauer, J.; Ferreira, J. M. F. Cosubstitution of Zinc and Strontium in β -Tricalcium Phosphate: Synthesis and Characterization. *J. Am. Ceram. Soc.* **2011**, 94 (1), 230–235.
- (45) Kumar, P. N.; Mishra, S. K.; Kannan, S. Probing the Limit of Magnesium Uptake by β -Tricalcium Phosphate in Biphasic Mixtures Formed from Calcium Deficient Apatites. *J. Solid State Chem.* **2015**, 231, 13–19.
- (46) Yamamoto, T.; Onga, T.; Marui, T.; Mizuno, K. Use of Hydroxyapatite to Fill Cavities after Excision of Benign Bone Tumors: Clinical Results. *J. Bone Jt. Surg.* **2000**, 82, 1117–1120.
- (47) Torres, P. M. C.; Vieira, S. I.; Cerqueira, A. R.; Pina, S.; Da Cruz Silva, O. A. B.; Abrantes, J. C. C.; Ferreira, J. M. F. Effects of Mn-Doping on the Structure and Biological Properties of β -Tricalcium Phosphate. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, 136, 57–66.
- (48) Pereira Moreira, M.; Dulce de Almeida Soares, G.; Dentzer, J.; Anselme, K.; Ágata de Sena, L.; Kuznetsov, A.; Araujo dos Santos, E. Synthesis of Magnesium- and Manganese-Doped Hydroxyapatite Structures Assisted by the Simultaneous Incorporation of Strontium. *Mater. Sci. Eng. C.* **2016**, 61, 736–743.
- (49) Dusek, P.; Roos, P. M.; Litwin, T.; Schneider, S. A.; Flaten, T. P.; Aaseth, J. The Neurotoxicity of Iron, Copper and Manganese in Parkinson's and Wilson's Diseases. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2015**, 31, 193–203.
- (50) Wang, L.; Luo, X.; Barbieri, D.; Bao, C.; Yuan, H. Controlling Surface Microstructure of Calcium Phosphate Ceramic from Random to Custom-Design. *Ceram. Int.* **2014**, 40 (6), 7889–7897.
- (51) Xie, H.; Wang, J.; Li, C.; Gu, Z.; Chen, Q.; Li, L. Application of Strontium Doped Calcium Polyphosphate Bioceramic as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Ceram. Int.* **2013**, 39 (8), 8945–8954.

- (52) Bose, S.; Fielding, G.; Tarafder, S.; Bandyopadhyay, A. Trace Element Doping in Calcium Phosphate Ceramics to Understand Osteogenesis and Angiogenesis. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31* (10), 1–25.
- (53) Luo, X.; Barbieri, D.; Davison, N.; Yan, Y.; De Bruijn, J. D.; Yuan, H. Zinc in Calcium Phosphate Mediates Bone Induction: In Vitro and in Vivo Model. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (1), 477–485.
- (54) Kannan, S.; Goetz-Neunhoeffler, F.; Neubauer, J.; Ferreira, J. M. F. Synthesis and Structure Refinement of Zinc-Doped β -Tricalcium Phosphate Powders. *J. Am. Ceram. Soc.* **2009**, *1595* (25587), 1592–1595.
- (55) Li, X.; Deng, Y.; Chen, X.; Xiao, Y.; Fan, Y.; Zhang, X. Gelatinizing Technology Combined with Gas Foaming to Fabricate Porous Spherical Hydroxyapatite Bioceramic Granules. *Mater. Lett.* **2016**, *185* (April), 428–431.
- (56) Kamitakahara, M.; Imai, R.; Ioku, K. Preparation and Evaluation of Spherical Ca-Deficient Hydroxyapatite Granules with Controlled Surface Microstructure as Drug Carriers. *Mater. Sci. Eng. C.* **2013**, *33* (4), 2446–2450.
- (57) Agnihotri, S. A.; Mallikarjuna, N. N.; Aminabhavi, T. M. Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery. *J. Control. Release* **2004**, *100* (1), 5–28.
- (58) Marques, Catarina Jose MF, Ferreira Ecaterina, Andronescu Fikai, Denisa Sonmez, Maria Fikai, A. Multifunctional Materials for Bone Cancer Treatment. *Int. J. Nanomedicine.* **2014**, *9*, 2713–2725.
- (59) Mitra, A. K.; Agrahari, V.; Mandal, A.; Cholkar, K.; Natarajan, C.; Shah, S.; Joseph, M.; Trinh, H. M.; Vaishya, R.; Yang, X.; Hao, Y.; Khurana, V.; Pal, D. Novel Delivery Approaches for Cancer Therapeutics. *J. Control. Release* **2015**, *219*, 248–268.
- (60) Zamoume, O.; Thibault, S.; Regnié, G.; Mecherri, M. O.; Fiallo, M.; Sharrock, P. Macroporous Calcium Phosphate Ceramic Implants for Sustained Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C.* **2011**, *31* (7), 1352–1356.
- (61) Demiralp, B.; Sarkar, G.; Okuno, S. H.; Yaszemski, M. J.; Maran, A. Osteosarcoma – An Evaluation of Current Diagnosis, Treatment and Chemotherapy. *Eur. Musculoskelet. Rev.* **2011**, *6*, 18–23.
- (62) Limback, J. M.; Letter, H. P.; Scherer, K. F.; Wasyliw, C. W.; Bancroft, L. W. ScienceDirect Recurrent Radiation-Induced Osteosarcoma of the Sternum in a

- Patient with Remote Radiation Therapy for Breast Cancer. *Radiol. Case Reports*. **2016**, *11* (4), 375–379.
- (63) Luetke, A.; Meyers, P. A.; Lewis, I.; Juergens, H. Osteosarcoma Treatment - Where Do We Stand? A State of the Art Review. *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40* (4), 523–532.
- (64) Picci, P. Osteosarcoma (Osteogenic Sarcoma). *Orphanet J. Rare Dis.* **2007**, *4*, 4–7.
- (65) Federman, N.; Bernthal, N.; Eilber, F. C.; Tap, W. D. The Multidisciplinary Management of Osteosarcoma. **2009**, 82–93.
- (66) Siclari, V. A.; Qin, L. Targeting the Osteosarcoma Cancer Stem Cell. *J. Orthop. Surg. Res.* **2010**, 1–10.
- (67) Majó, J.; Cubedo, R.; Pardo, N. Revista Española de Cirugía Ortopédica Y Traumatología Treatment of Osteosarcoma . A Review. *Rev. española cirugía ortopédica y Traumatol. (English Ed.* **2010**, *54* (5), 329–336.
- (68) Al-Rashid, M.; Ramkumar, B. D.; Raskin, K.; Schwab, J.; Hornicek, F. J.; Lozano-Calderón, S. A. Paget Disease of Bone. *Orthop. Clin. North Am.* **2015**, *46*, 577–585.
- (69) Wang, C.; Yin, Q.; Liao, J.; Lou, J.; Ding, X.; Zhu, Y.; Chen, K. Primary Diaphyseal Osteosarcoma in Long Bones: Imaging Features and Tumor Characteristics. *Eur. J. Radiol.* **2012**, *81* (11), 3397–3403.
- (70) Gibbs, C. P.; Levings, P. P.; Ghivizzani, S. C. Evidence for the Osteosarcoma Stem Cell. *Curr. Orthop. Pract.* **2012**, *22* (4), 322–326.
- (71) Tang, N.; Song, W. Osteosarcoma Development and Stem Cell Differentiation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2008**, *466*, 2114–2130.
- (72) Lee, O. K.; Kuo, T. K.; Chen, W.; Lee, K.; Hsieh, S.; Chen, T. Isolation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Blood* **2004**, *103* (5), 1669–1676.
- (73) Bieback, K.; Kern, S.; Kluter, H.; Eichler, H. Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells* **2004**, *103*, 625–634.
- (74) Botter, S. M.; Neri, D.; Fuchs, B. Recent Advances in Osteosarcoma. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, *16*, 15–23.
- (75) Carrle, D.; Bielack, S. S. Current Strategies of Chemotherapy in Osteosarcoma.

- Int. Orthop.* **2006**, *30*, 445–451.
- (76) Marina, N. M.; Smeland, S.; Bielack, S. S.; Bernstein, M.; Jovic, G.; Krailo, M. D.; Hook, J. M.; Arndt, C.; Eriksson, M.; Gebhardt, M. C.; Gelderblom, H.; Gerss, J.; Goldsby, R.; Goorin, A.; Gorlick, R.; Grier, H. E.; Hale, J. P.; Nathrath, M.; Papai, Z.; Randall, R. L.; Reichardt, P.; Renard, M.; Safwat, A. A.; Schwartz, C. L.; Stevens, M. C. G.; Strauss, S. J.; Teot, L.; Werner, M.; Sydes, M. R.; Whelan, J. S. Comparison of MAPIE versus MAP in Patients with a Poor Response to Preoperative Chemotherapy for Newly Diagnosed High-Grade Osteosarcoma (EURAMOS-1): An Open-Label, International, Randomised Controlled Trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1396–1408.
- (77) Lucas, A. T.; Neal, S. K. O.; Santos, C. M.; White, T. F.; Zamboni, W. C. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis A Sensitive High Performance Liquid Chromatography Assay for the Quantification of Doxorubicin Associated with DNA in Tumor and Tissues. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *119*, 122–129.
- (78) Yang, F.; Teves, S. S.; Kemp, C. J.; Henikoff, S. Biochimica et Biophysica Acta Doxorubicin , DNA Torsion , and Chromatin Dynamics. *BBA - Rev. Cancer* **2014**, *1845* (1), 84–89.
- (79) Kim, D. W.; Kim, K.; Shin, M. J.; Ha, J. H.; Seo, S. W.; Yang, J.; Lee, F. Y. siRNA-Based Targeting of Antiapoptotic Genes Can Reverse Chemoresistance in P-Glycoprotein Expressing Chondrosarcoma Cells. *Mol. Cancer* **2009**, *10*.
- (80) Kundu, B.; Ghosh, D.; Sinha, M. K.; Sen, P. S.; Balla, V. K.; Das, N.; Basu, D. Doxorubicin-Intercalated Nano-Hydroxyapatite Drug-Delivery System for Liver Cancer: An Animal Model. *Ceram. Int.* **2013**, *39* (8), 9557–9566.
- (81) Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. A Review of Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. *J. Control. Release* **2008**, *126*, 187–204.
- (82) Kubo, T.; Doi, K.; Hayashi, K.; Morita, K.; Matsuura, A.; Teixeira, E. R.; Akagawa, Y. Comparative Evaluation of Bone Regeneration Using Spherical and Irregularly Shaped Granules of Interconnected Porous Hydroxylapatite. A Beagle Dog Study. *J. Prosthodont. Res.* **2011**, *55* (2), 104–109.
- (83) Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Bioceramics for Drug Delivery. *Acta Mater.* **2013**, *61*, 890–911.
- (84) Genin, F. Y.; Luo, P.; Dash, K. Hydroxyapatite Based Drug Delivery Implant for

- Cancer Treatment. *US Pat.* **2004**, 6, 767 550.
- (85) Torres, P. M. C.; Abrantes, J. C. C.; Kaushal, A.; Pina, S.; Döbelin, N.; Bohner, M.; Ferreira, J. M. F. Influence of Mg-Doping, Calcium Pyrophosphate Impurities and Cooling Rate on the Allotropic $\alpha \leftrightarrow \beta$ -Tricalcium Phosphate Phase Transformations. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2016**, 36, 817–827.
- (86) Kannan, S.; Ventura, J. M.; Ferreira, J. M. F. Aqueous Precipitation Method for the Formation of Mg-Stabilized β -Tricalcium Phosphate: An X-Ray Diffraction Study. *Ceram. Int.* **2007**, 33, 637–641.
- (87) Destainville, A.; Champion, E.; Laborde, E. Synthesis, Characterization and Thermal Behavior of Apatitic Tricalcium Phosphate. *Materials Chemistry and Physics.* **2003**, 80, 269–277.
- (88) Cüneyt Tas, A. Synthesis of Biomimetic Ca-Hydroxyapatite Powders at 37°C in Synthetic Body Fluids. *Biomaterials.* **2000**, 21 (14), 1429–1438.
- (89) Park, J.; Fong, P. M.; Lu, J.; Russell, K. S.; Booth, C. J.; Saltzman, W. M.; Fahmy, T. M. PEGylated PLGA Nanoparticles for the Improved Delivery of Doxorubicin. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2009**, 5 (4), 410–418.
- (90) Luu, H. H.; Kang, Q.; Jong, K. P.; Si, W.; Luo, Q.; Jiang, W.; Yin, H.; Montag, A. G.; Simon, M. A.; Peabody, T. D.; Haydon, R. C.; Rinker-Schaeffer, C. W.; He, T. C. An Orthotopic Model of Human Osteosarcoma Growth and Spontaneous Pulmonary Metastasis. *Clin. Exp. Metastasis.* **2005**, 22 (4), 319–329.
- (91) Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. Pitfalls of the MTT Assay: Direct and off-Target Effects of Inhibitors Can Result in Over/underestimation of Cell Viability. *Gene.* **2015**, 574 (2), 193–203.
- (92) Dhamecha, D.; Jalalpure, S.; Jadhav, K. Doxorubicin Functionalized Gold Nanoparticles: Characterization and Activity against Human Cancer Cell Lines. *Process Biochem.* **2015**, 50 (12), 2298–2306.
- (93) Gerber, G. B.; Léonard, A. Carcinogenicity, Mutagenicity and Teratogenicity of Manganese Compounds. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, 42, 25–34.
- (94) Torres, P. M. C.; Gouveia, S.; Olhero, S.; Kaushal, A.; Ferreira, J. M. F. Acta Biomaterialia Injectability of Calcium Phosphate Pastes: Effects of Particle Size and State of Aggregation of β -Tricalcium Phosphate Powders. *Acta Biomater.* **2015**, 21, 204–216.
- (95) Rodríguez-Lorenzo, L. M.; Vallet-Regi, M.; Ferreira, J. M. F. Colloidal Processing

- of Hydroxyapatite. *Biomaterials* **2001**, 22, 1–6.
- (96) Papo, A.; Piani, L.; Ricceri, R. Sodium Tripolyphosphate and Polyphosphate as Dispersing Agents for Kaolin Suspensions: Rheological Characterization. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, 201, 219–230.
- (97) Cini, N.; Ball, V. Polyphosphates as Inorganic Polyelectrolytes Interacting with Oppositely Charged Ions, Polymers and Deposited on Surfaces: Fundamentals and Applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, 209, 84–97.
- (98) Arias, J. L.; Gómez-Gallo, A.; Delgado, Á. V.; Gallardo, V. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Study of the Stability of Kollidon® SR Suspensions for Pharmaceutical Applications. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2009**, 338, 107–109.
- (99) Zhu, K.; Yanagisawa, K.; Shimanouchi, R.; Onda, A.; Kajiyoshi, K. Preferential Occupancy of Metal Ions in the Hydroxyapatite Solid Solutions Synthesized by Hydrothermal Method. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2006**, 26, 509–513.
- (100) Champion, E. Acta Biomaterialia Sintering of Calcium Phosphate Bioceramics. *Acta Biomater.* **2013**, 9 (4), 5855–5875.
- (101) Shazni, Z. A.; Mariatti, M.; Nurazreena, A.; Razak, K. A. Properties of Calcium Phosphate Scaffolds Produced by Freeze- Casting. *Procedia Chem.* **2016**, 19, 174–180.
- (102) Takeuchi, A.; Tsuge, T.; Kikuchi, M. Preparation of Porous β -Tricalcium Phosphate Using Star Fi Sh-Derived Calcium Carbonate as a Precursor. *Ceram. Int.* **2016**, 42 (14), 15376–15382.
- (103) Fan, L.; Ge, H.; Zou, S.; Xiao, Y.; Wen, H.; Li, Y.; Feng, H.; Nie, M. International Journal of Biological Macromolecules Sodium Alginate Conjugated Graphene Oxide as a New Carrier for Drug Delivery System. *J. Biol. Macromolec.* **2016**, 93, 582–590.
- (104) Khuathan, N.; Pongjanyakul, T. Modification of Quaternary Polymethacrylate Films Using Sodium Alginate: Film Characterization and Drug Permeability. *Int. J. Pharm.* **2014**, 460 (1–2).

