



**Ana Filipa Marques
Rodrigues**

**Fabrico de estruturas porosas multifuncionais por
manufatura aditiva**



**Ana Filipa Marques
Rodrigues**

**Fabrico de estruturas porosas multifuncionais por
manufatura aditiva**

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 do Doutora Susana Maria Henriques Olhero, Investigadora Auxiliar no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, da Doutora Paula Maria da Costa Torres, Investigadora de Pós-Doutoramento no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Ana Francisca Bettencourt, Professora na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

A tudo o que me faz feliz...

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida
Professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Professor Doutor José Martinho Marques de Oliveira
Professor Coordenador S/ Agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Susana Maria Henriques Olhero
Investigadora Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao longo de vários meses de trabalho, chegou a hora de expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram para a realização desta dissertação, a concretização de mais uma etapa da minha vida.

Em primeiro lugar, às minhas orientadoras Doutora Susana Olhero e Doutora Paula Torres pela exemplar orientação. Agradeço por toda a ajuda imprescindível, acompanhamento, paciência, disponibilidade e convivência durante todo este tempo, permitindo-me crescer tanto a nível profissional como pessoal.

À minha coorientadora Ana Francisca Bettencourt, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pela ajuda e partilha de conhecimentos, pela hospitalidade com que me recebeu e a disponibilidade que demonstrou ao longo do trabalho.

Aos técnicos do DEMaC e CICECO pela disponibilidade e ajuda prestada.

Ao Doutor João Abrantes pela contribuição e paciência nas análises de DRX por refinamento de Rietveld.

Ao Doutor João Horta, Doutor João Amaral e Professor Vítor Amaral pela disponibilidade e cooperação nas análises das medidas magnéticas e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Doutor Vítor Gaspar pelo apoio, simpatia e disponibilidade nas análises de fluorescência dos *scaffolds*.

Ao Doutor Manuel Bañobre-López do INL (*International Iberian Nanotechnology Laboratory*) pela disponibilização do equipamento de hipertermia para a obtenção dos resultados magneto-térmicos.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda, acolhimento e boa disposição. Agradeço de forma especial à Andreia, ao Manel, à Maria João e à Tânia, que muitas vezes despenderam do seu tempo para me ajudar e pela partilha de conhecimentos, e claro pelos bons momentos passados.

Às amigas especiais que a vida académica me deu, a Adriana, a Carmen, a Elisa, a Maria João, e a Viviana. Obrigada pela amizade, pelo apoio, pela paciência e pelos bons e grandes momentos partilhados ao longo destes anos. Não é de sempre mas é para sempre.

Às minhas grandes amigas de infância, Andreia Ribeiro, Daniela Duarte e Daniela Reis por estarem sempre ao meu lado a apoiar-me.

Ao Daniel um especial agradecimento pela incansável força, carinho e compreensão que sempre demonstrou.

Aos familiares que demonstraram o seu apoio e preocupação.

Aos pilares da minha vida, os meus pais e o meu irmão, por todo o amor, sacrifícios, motivação, por terem sempre as palavras certas nos momentos mais difíceis e por me ajudarem incondicionalmente a alcançarem os meus sonhos. Um obrigada do fundo do coração!

palavras-chave

Regeneração óssea, HA e β -TCP, Ferro, *scaffolds* compósitos, robocasting, liberação de fármaco, hipertermia.

resumo

Este trabalho teve como objetivo maioritário o desenvolvimento de *scaffolds* multifuncionais capazes de (1) preencher um defeito ósseo e contribuir ativamente na regeneração óssea, (2) matar células tumorais residuais por hipertermia quando submetido a um campo magnético e (3) prevenir/ tratar localmente infecções por liberação controlada de um fármaco incorporado.

Pós de HA e β -TCP puros e dopados com 6 mol% de íons Ferro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^3$), sintetizados por precipitação química em meio aquoso e tratados termicamente a 1100°C, foram caracterizados por DRX, FTIR, distribuição de tamanhos de partícula, SEM, respostas magnética e magneto-térmica. Estes foram incorporados numa solução aquosa de quitosano para obtenção de pastas, e posterior fabrico de *scaffolds* compósitos usando o robocasting como técnica de manufatura aditiva. A eliminação da etapa de sinterização nos *scaffolds* permitiu a incorporação de um antibiótico (levofloxacina) nas pastas compósitas à base de pós dopados, de forma a obter substitutos ósseos com capacidade de prevenir infecções por liberação local do fármaco. Foram preparadas pastas com uma percentagem de 34 vol.% e 40 vol.% de sólidos para os pós puros e dopados, respetivamente, adicionando genipina como agente reticulante do quitosano. Com estas pastas foi possível obter *scaffolds* com diferentes porosidades (300 μm , 500 μm e um gradiente 300-500-300 μm segundo o eixo dos zz), que foram avaliados quanto ao seu desempenho mecânico e microestrutural.

As pastas mostraram ter propriedades reológicas adequadas para o processo de impressão por robocasting. Os *scaffolds* obtidos, puros e dopados com e sem levofloxacina, não mostraram diferenças significativas na microestrutura e apresentaram propriedades mecânicas promissoras para a aplicação pretendida. Os estudos de liberação de fármaco revelaram uma rápida liberação de levofloxacina nas primeiras 6h, em todos os *scaffolds* de diferentes porosidades. Embora a dopagem com íons ferro tenha dado origem a pós com magnetização entre 0,1-0,5 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ a 40000 Oe, estes não apresentaram resposta magneto-térmica. A adição de 1 wt.% de nanopartículas magnéticas à pasta preparada com a mistura dos pós dopados com Ferro, originou um aumento de 7°C ao fim de 10 min., quando aplicado um campo magnético alternado de 337 kHz. Esta resposta magneto-térmica, embora não seja ideal para aplicação em tratamentos por hipertermia, foi superior quando comparada com a pasta preparada com os pós puros misturados com o mesmo teor de nanopartículas (aumento de 2°C em 10min.), mostrando a existência de um efeito sinérgico entre os pós dopados e as nanopartículas, o que comprova a vantagem dos pós dopados com íon ferro.

O trabalho desenvolvido mostra avanços muito positivos no fabrico de *scaffolds* multifuncionais, com capacidades promissoras para regeneração óssea, tratamento local de infecções e hipertermia.

keywords

Bone regeneration, HA and β -TCP, iron, composite scaffolds, robocasting, drug delivery, hyperthermia.

abstract

The main goal of this work was to develop multifunctional scaffolds able to (1) fill a bone defect and actively contribute in bone regeneration, (2) kill residual tumor cells by hyperthermia when submitted to a magnetic field and (3) prevent/treat local infections by controlled release of an incorporated drug.

HA and β -TCP pure and 6 mol% iron doped ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) powders, synthesized by aqueous precipitation process and thermally treated, were characterized by DRX, FTIR, particle size distribution, SEM, as well as, magnetic and magnetothermal responses. These powders were incorporated into an aqueous solution of chitosan to obtain inks, which were subsequently extruded by robocasting as additive manufacturing technique, to obtain composite scaffolds. The elimination of the sintering step in the scaffolds fabrication allowed the incorporation of an antibiotic (levofloxacin) into the composite inks (iron doped powders based), in order to obtain bone substitutes with the capacity to prevent infections by local drug release. Inks containing 34 vol.% and 40 vol.% of solids for non-doped and doped powders, respectively, were prepared, adding genipin as crosslinking agent of chitosan. Scaffolds with different porosities (300 μm , 500 μm and a gradient 300-500-300 μm according to the zz axis), were successfully obtained and characterized in terms of mechanical and microstructural properties.

All pastes showed rheological properties suitable for robocasting printing process. The obtained scaffolds, non-doped and doped, with or without levofloxacin, did not show significant differences in the microstructure, presenting promising mechanical properties for the intended application. Drug release studies revealed a fast release of levofloxacin in the first 6h in all scaffolds with different porosities. Although doping with iron ions gave rise to powders with magnetization between 0,1-0,5 $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ at 40000 Oe, magnetothermal response was not noticeable. The addition of 1 wt.% of magnetic nanoparticles to these powders resulted in 7°C increase after 10 min. under a alternating magnetic field of 337 kHz. This magnetothermal response, although not ideal for application in hyperthermia treatments, was superior when compared to the non-doped powders mixed with the same content of nanoparticles (increase of 2°C in 10min), exhibiting the existence of a synergistic effect between the doped powders and the nanoparticles.

The work developed throughout this thesis shows highly advances in the manufacture of multifunctional scaffolds, with promising capabilities for bone regeneration, treatment of local infections and hyperthermia.

Índice

Índice de figuras	iii
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	ix
Introdução geral	1
Objetivos e Estratégias	3
Estrutura da dissertação	4
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	5
1.1. O Osso.....	7
1.1.1. Macroestrutura do osso.....	7
1.1.2. Microestrutura do osso	8
1.1.3. Propriedades mecânicas.....	9
1.1.4. Remodelação e regeneração óssea.....	10
1.1.5. Tumores ósseos	12
1.2. Estratégias para regeneração de tecido ósseo	14
1.2.1. <i>Scaffolds</i> como substitutos ósseos	15
1.3. Biomateriais utilizados em <i>scaffolds</i>	17
1.3.1. Fosfatos de cálcio	18
1.3.1.1. Substituição iónica em fosfatos de cálcio	22
1.3.2. Compósitos	24
1.4. <i>Scaffolds</i> magnéticos como substitutos ósseos	26
1.4.1. Estudos Realizados	27
1.4.2. Tratamento do cancro por hipertermia	29
1.5. Libertação controlada de fármaco.....	30
1.5.1. Levofloxacina	33
1.6. Técnicas para fabrico de <i>scaffolds</i>	34
1.6.1. Técnicas convencionais	34
1.6.2. Manufatura aditiva.....	36
Capítulo 2 - Procedimento experimental.....	41
2.1. Materiais	43
2.2. Métodos de preparação	43

2.2.1.	Síntese de pós de CaP puros e dopados com ferro	43
2.2.2.	Preparação das pastas com e sem fármaco	45
2.2.3.	Preparação dos <i>scaffolds</i>	48
2.3.	Técnicas de caracterização.....	50
2.3.1.	Caracterização dos pós	50
2.3.2.	Caracterização das pastas	51
2.3.3.	Caracterização dos <i>scaffolds</i>	52
2.4.	Ensaio de liberação de fármaco.....	54
2.5.	Avaliação das propriedades magnéticas e magneto-térmicas	55
Capítulo 3 - Resultados e Discussão		57
3.1.	Caracterização dos pós.....	59
3.2.	Caracterização das pastas.....	69
3.3.	Caracterização dos <i>scaffolds</i>	75
3.4.	Ensaio <i>in vitro</i> de liberação de fármaco	83
3.5.	Caracterização magnética e magneto-térmica	86
Capítulo 4 - Conclusões e trabalhos futuros		91
4.1.	Conclusões	93
4.2.	Trabalhos Futuros	96
Referências		97

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura e constituição do osso.....	8
Figura 2 - Processo de remodelação óssea.....	11
Figura 3 - Desenvolvimento de um tumor..	13
Figura 4 - Esquema das três abordagens principais da engenharia de tecidos que podem ser usadas para regenerar defeitos nos tecidos ósseos.....	15
Figura 5 - Reticulação do quitosano pela genipina.....	25
Figura 6 - Scaffolds magnéticos mais estudados.....	27
Figura 7 - Tratamento do cancro com ressecção tumoral e posterior efeito hipertérmico.....	30
Figura 8 - Perfil dos níveis de concentração de fármaco na circulação sistémica com administrações de sucessivas doses (A1, A2, ...) em comparação com um perfil ideal de concentração (B).....	31
Figura 9 - Estrutura química da levofloxacina.	33
Figura 10 - Técnica Salt sintering.....	35
Figura 11 - Técnica esponja polimérica.....	35
Figura 12 - Técnica espuma cerâmica.....	36
Figura 13 - Equipamento de robocasting.....	38
Figura 14 - Esquema do processo da síntese dos pós.....	44
Figura 15 - Imagens de SEM de cápsulas de gelatina incorporadas com levofloxacina...	47
Figura 16 - Equipamento robocasting para impressão de scaffolds.....	48
Figura 17 - Modelos dos scaffolds, visto do topo, com um tamanho de poro: a) 300 µm, b) 500 µm e c) Gradiente. (d) secção transversal AA' do modelo do scaffold gradiente apresentado em c.	49
Figura 18 - a) Equipamento utilizado para realização dos ensaios mecânicos; b) Scaffold entre as duas placas de compressão durante o ensaio.	53
Figura 19 - Cada amostra é imersa em 25 mL de HEPES num tubo Falcon em banho-maria a 37°C e 130 rpm (A) . Após um tempo predeterminado ser atingindo são coletados 3 mL de cada amostra (B) . De seguida, alíquotas de 200 µL, de cada amostra de 3 mL, são transferidas em triplicado para uma microplaca de 96 poços e analisadas por espectrometria UV/visível a 333 nm (C)	54
Figura 20 - Tonalidades dos pós produzidos.	59

Figura 21 - (a) Espectros de DRX dos pós puros (TCP e HA) e dos pós dopados (FeTCP e FeHA) calcinados a 1100°C; (b) Ampliação da Figura 21a, em 2 θ entre 29-35°, para mostrar o efeito da dopagem do β -TCP nos picos de DRX; (c) Ampliação da Figura 21a, em 2 θ entre 29-35°, para mostrar o efeito da dopagem da HA nos picos de DRX.....	60
Figura 22 - Influência da dopagem de nos parâmetros de rede do β -TCP (a) e da HA (b)	62
Figura 23 - (a) Espectros de FTIR dos pós puros, TCP e HA, e dopados, FeTCP e FeHA, calcinados a 1100°C; (b) Ampliação da área 1600-400 cm ⁻¹ para uma melhor visualização das diferenças entre os pós puros e dopados.	63
Figura 24 - Curvas de distribuição dos tamanhos de partícula dos pós, incluindo o D10, D50, D90, Dmédio e a ASE. D10- 10% do total de partículas está abaixo do valor apresentado; D50- 50% do total de partículas está abaixo do valor apresentado; D90- 90% do total de partículas está abaixo do valor apresentado; Dmédio- tamanho médio das partículas; ASE- área superficial específica das partículas.	65
Figura 25 - Micrografias obtidas por SEM dos pós estudados: TCP (a e b) , FeTCP (c e d) , HA (e e f) e FeHA (g e h)	66
Figura 26 - Imagens de SEM e respetivo mapeamento químico obtido pelo sistema de análise EDS para as diferentes composições de pó. Os pontos azuis representam o cálcio, os pontos verdes o fósforo e os pontos vermelhos o ferro.	68
Figura 27 - Evolução do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') com o tempo, a uma temperatura de 25°C para: (a) pastas puras (HATCP) e dopadas (FeHATCP) com 30 vol.% de sólidos e (b) pastas puras (HATCP-2,5L) e dopadas (FeHATCP-2,5L) na presença de levofloxacina com 25 vol.% de sólidos. Todas as medidas foram feitas em pastas na ausência de genipina.	70
Figura 28 - Evolução do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') com o tempo, das pastas puras (HATCP) e dopadas (FeHATCP) com 20 vol.% de pó disperso em 80 vol.% de uma solução de quitosano (5 wt.%) na presença de genipina, a uma temperatura de 25°C (a) e a uma temperatura de 37°C. (b)	72
Figura 29 - Amplitude sweep das pastas finais puras e dopadas, com 34, 40 vol.% sólidos, respetivamente, a 25°C, 10 min após a adição da genipina (HATCP-10min, FeHATCP-10min, FeHATCP-2,5L-10min) e 45 min após a adição da genipina (FeHATCP-45min).....	73
Figura 30 - Scaffolds puros (HATCP) e dopados (FeHATCP), com diferentes tamanhos de poro, obtidos por robocasting. As imagens, obtidas por uma lupa, são compostas por uma vista de topo (imagem maior) e por uma vista 3D (imagem menor). Escala de 2 mm.....	75
Figura 31 - Micrografias de SEM dos scaffolds HATCP, FeHATCP e FeHATCP-2,5L, para os diferentes tamanhos de poro. As imagens apresentam uma vista lateral dos scaffolds.....	76

Figura 32 - Imagens SEM da microestrutura dos scaffolds HATCP, FeHATCP, FeHATCP-2,5L, com um tamanho de poro de 300: (a,b,c) superfície do filamento e (d,e,f) interior do filamento.	78
Figura 33 - Imagens de fluorescência dos scaffolds FeHATCP-2,5L, para os diferentes tamanhos de poro. Os canais utilizados são o DAPI (azul), GFP (verde), Rodhamine (laranja.)	79
Figura 34 - Resistência à compressão dos scaffolds com diferentes composições, com tamanho de poro de 300 μm , 500 μm , e gradiente.....	80
Figura 35 - Curva de calibração da levofloxacina e respetiva equação de ajuste.....	83
Figura 36 - (a) Perfil de libertação in vitro da levofloxacina a partir dos scaffolds FeHATCP-2,5L com diferentes porosidades durante 72 h; (b) Aproximação dos perfis para as primeiras 6 h.....	84
Figura 37 - (a) Perfil de libertação in vitro da levofloxacina a partir dos scaffolds FeHATCP-0,1L e FeHATCP-0,1LC, com diferentes porosidades. Aproximação dos perfis nas primeiras 6 h dos scaffolds com uma porosidade de: (b) 500 μm , (c) 300 μm e (d) gradiente.....	85
Figura 38 - Curva de magnetização da amostra FeHA, FeTCP, FeHATCP, HATCP-1%Nano e FeHATCP-1%Nano.....	86
Figura 39 - Curva de magnetização das nanopartículas de magnetite.....	88
Figura 40 - a) Capacidade de aquecimento (hipertérmica) dos pós FeHA, FeTCP e das pastas HATCP 1%Nano e FeHATCP-1%Nano, num intervalo de tempo de 0-600s. b) Ampliação da curva FeHATCP-1%Nano para um intervalo de tempo de análise 0-4000s.....	89

Índice de tabelas

Tabela 1 - Propriedades mecânicas e porosidade do osso.	10
Tabela 2 - Fosfatos de cálcio mais comuns.	20
Tabela 3 – Concentração máxima (vol.%) de sólidos e concentração (wt.%) de cada pó (em relação à massa de sólidos) que se conseguiu obter nas pastas aquando preparadas com uma solução de 3 wt.% e 5 wt.% CH dissolvidas em 10 wt.% de AC.	46
Tabela 4 - Composição das pastas de FeHATCP na presença de levofloxacina encapsulada e não encapsulada.	47
Tabela 5 - Características dos modelos desenhados para cada scaffold.	49
Tabela 6 - Análise quantitativa das fases cristalinas dos pós estudados, obtida por refinamento de Rietveld.	61
Tabela 7 - Análise quantitativa, obtida por refinamento de Rietveld, das fases cristalinas presentes nas misturas de pós usadas para a preparação de pastas puras e dopadas.	69
Tabela 8 - Módulos de Young obtidos para scaffolds com diferentes composições, com tamanho de poro de 300 µm, 500 µm, e gradiente.	82

Lista de abreviaturas

3D	Tridimensional Three-dimensional
AA	Ácido acético Acetic acid
AC	Ácido cítrico Citric Acid
ALP	Fosfatase Alcalina Alkaline Phosphatase
AMF	Campo magnético alternado Alternated magnetic field
ASE	Área superficial específica Specific surface área
BCP	Fosfato de cálcio bifásico Biphasic calcium phosphate
BET	Método de Brunauer, Emmet e Tellerum Brunauer, Emmet and Tellerum method
CAD	Desenho computadorizado Computer aided design
CaP	Fosfato de cálcio Calcium phosphate
CH	Quitosano Chitosan
CPP	Pirofosfato de cálcio Calcium pyrophosphate
DRX	Difração de raios-X X-ray diffraction

EDS	Espectrómetro de energia dispersiva Energy dispersive spectroscopy
FeHA	Pó de HA dopada com ferro Iron doped HA powder
FeHATCP	Pó de HA + β -TCP dopado com ferro Iron doped HA + β -TCP powder
FeTCP	Pó de β -TCP dopado com ferro Iron doped β -TCP powder
FTIR	Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier Fourier-transform infrared spectroscopy.
HA	Hidroxiapatite Hydroxyapatite
HATCP	Pó de HA + β -TCP HA + β -TCP powder
ICP-OES	Espectroscopia de emissão atômica por plasma Inductively coupled particles – optical emission spectroscopy
NPMs	Nanopartículas magnéticas Magnetic nanoparticles
PCL	Poli(ϵ -caprolactona) Poly(ϵ -caprolactone)
PGA	Ácido poliglicólico Polyglycolic acid
PLA	Ácido polilático Polylactic acid
PLGA	Ácido láctico-co-glicólico Lactic-co-glycolic acid

PVP	Poli-Vinil Pirrolidona Polyvinylpyrrolidone
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento Scanning electron mycroscopy
SMF	Campo magnético estático Static magnetic field
SPIONs	Nanoparticulas de óxido de ferro superparamagnéticas Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
TCP	Fosfato tricálcico Tricalcium phosphate
Vol. %	Percentagem em volume Percentage in volume
Wt. %	Percentagem em peso Percentage in weight

Introdução geral

A melhoria das condições de vida e da prestação de cuidados médicos conduz a um aumento da esperança média de vida e ao conseqüente envelhecimento da população, aumentando a probabilidade de aparecimento de doenças ósseas. Quando se verificam alterações na estrutura dos ossos, devido a lesões ou doenças, o equilíbrio fisiológico deste tecido e do próprio organismo sofre uma grande alteração, afetando a qualidade de vida do indivíduo.¹

Ao contrário de outros tecidos, os tecidos ósseos têm a capacidade de se autorregenerar/reparar em casos de pequenos defeitos. No entanto, para defeitos ósseos críticos ($> 1 \text{ cm}^3$), causados por exemplo, por traumas, ressecções tumorais e anormalidades esqueléticas ou casos em que o processo regenerativo está comprometido, incluindo necrose avascular e osteoporose, o processo de reparação é mais exigente o que leva à falha da cicatrização e da reparação, necessitando assim de um suporte/preenchimento.^{2,3} O tumor ósseo maligno é uma das principais doenças ósseas e o seu tratamento envolve normalmente a combinação de várias terapias invasivas: cirurgia com ressecção tumoral, quimioterapia e/ou radioterapia. Na remoção do tecido ósseo afetado, a eliminação completa de células ósseas cancerígenas residuais não é garantida, sendo assim necessário recorrer a terapias complementares como a quimioterapia e a radioterapia.³

O desenvolvimento de um biomaterial multifuncional que seja capaz de (1) preencher um defeito ósseo e contribuir ativamente na regeneração óssea, (2) incorporar um fármaco permitindo a sua libertação localmente e (3) matar células tumorais residuais, trará benefícios não oferecidos pela prática médica convencional.⁴ Cientistas e médicos têm realizado trabalhos para fabricar estruturas porosas tridimensionais (*scaffolds*) para regeneração óssea, incorporando diferentes biomoléculas com funcionalidades clinicamente importantes.^{3,5-8} A libertação controlada de fármacos incorporados em *scaffolds* poderá prevenir infeções e recorrência de cancro localmente e, simultaneamente, acelerar o processo regenerativo dos tecidos, contornando as preocupações com os potenciais efeitos sistémicos indesejáveis de um medicamento no organismo.⁹

Alguns biopolímeros, como por exemplo, a policaprolactona (PCL) e o poliácido láctico-co-glicólico (PLGA) têm vindo a ser estudados para o fabrico de *scaffolds* para

regeneração óssea .^{10,11} No entanto, devido à sua hidrofobicidade, dificuldade no controlo de libertação de fármacos e baixa osteocondutividade, os *scaffolds* à base de polímeros mostram limitações no seu desempenho.¹² Os materiais cerâmicos da família dos fosfatos de cálcio têm sido bastante utilizados em engenharia de tecido ósseo, nomeadamente no fabrico de *scaffolds*, uma vez que a sua composição química é muito similar à parte mineral do osso (cálcio e fósforo). Além disso, eles são biocompatíveis, bioativos, osteocondutores e potencialmente osteoindutores.^{13,14} Devido ao facto do osso ser um material magneto-sensível, a utilização de agentes dopantes magnéticos na estrutura das fases cristalinas dos fosfatos de cálcio, pode potenciar ainda mais estas propriedades destes materiais.¹⁵

De facto, o desenvolvimento de *scaffolds* à base de fosfatos de cálcio (CaPs) dopados com iões magnéticos, tem recebido recentemente uma crescente atenção por parte da comunidade científica e médica, devido à capacidade de promoverem a regeneração e reparação do osso, quando sujeitos a um campo magnético de adequada intensidade.¹⁶ Para além disso e, tendo em conta que temperaturas acima da temperatura corporal normal ($\approx 37^\circ\text{C}$) são capazes de parar o crescimento tumoral e assim limitar o desenvolvimento do cancro, o desenvolvimento de *scaffolds* magnéticos com uma resposta hipertérmica (capacidade de induzir calor quando sujeitos a um campo magnético) mostram ter um enorme potencial na área da medicina regenerativa, nomeadamente na área do tratamento do cancro.^{3,15,17-19}

A arquitetura do *scaffold* é crucial para conferir propriedades mecânicas adequadas e um transporte eficaz de nutrientes, promover interações celulares e um bom crescimento ósseo. Esta necessidade de produzir materiais com formas e porosidades controladas, impulsionou o desenvolvimento de novas tecnologias de processamento de biomateriais. O robocasting é uma técnica de fabrico aditivo, que permite obter com precisão *scaffolds* tridimensionais (3D) com uma estrutura reticulada predefinida, a partir da extrusão de pastas cerâmicas e/ou poliméricas à temperatura ambiente.^{20,21} No entanto, após a impressão, os *scaffolds* de base cerâmica são normalmente submetidos a uma etapa de sinterização a altas temperaturas ($>900^\circ\text{C}$) para obter propriedades mecânicas adequadas, inviabilizando a adição de biomoléculas na fase de preparação das pastas. Desta forma, a incorporação de biomoléculas, como por exemplo fármacos, é feita após sinterização, por imersão do *scaffold* em soluções com concentrações elevadas do fármaco.^{6,12} Este procedimento tem

fortes limitações relacionadas com o controlo da quantidade de fármaco que é possível impregnar, que depende da capacidade de absorção do *scaffold*, bem como das suas características superficiais.

Eliminar o processo de sinterização na obtenção de *scaffolds* de base cerâmica (fosfatos de cálcio), seria uma solução viável para superar estas dificuldades, bem como uma alternativa inovadora para o fabrico de biocomponentes multifuncionais porosos por manufatura aditiva.

Objetivos e Estratégias

O presente trabalho tem como principal objetivo o fabrico de *scaffolds* compósitos multifuncionais de base cerâmica por robocasting, com propriedades mecânicas adequadas para substituição óssea, sem utilização do processo de sinterização no seu fabrico. Pretende-se obter substitutos ósseos com capacidade de: (1) ativar uma série de vias de sinalização intracelular para estimular a regeneração óssea, (2) matar células tumorais residuais por hipertermia quando aplicado um campo magnético e (3) tratamento local de infeções por libertação controlada de um fármaco incorporado.

Para atingir este objetivo traçaram-se os seguintes passos/estratégias:

- para promover a regeneração óssea e uma possível resposta hipertérmica sob aplicação de um campo magnético foram sintetizados pós à base de fosfatos de cálcio (hidroxiapatite, HA e β -fosfato tricálcico, β -TCP) dopados com iões ferro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$);
- para a eliminação do processo de sinterização na obtenção de *scaffolds* como substitutos ósseos, foram desenvolvidas pastas compósitas com características reológicas adequadas para impressão por robocasting, à base de fosfatos de cálcio/quitosano, alcançando as propriedades mecânicas adequadas através da polimerização do quitosano por reticulação com genipina;
- para o tratamento local de infeções e, como alternativa para melhorar a resposta hipertérmica, foram incorporados respetivamente, um fármaco e nanopartículas magnéticas durante a preparação das pastas, mantendo a sua capacidade de impressão por robocasting.

Estrutura da dissertação

A presente dissertação está dividida em 4 capítulos:

- Inicialmente é apresentado um enquadramento geral ao tema da dissertação, objetivos do trabalho proposto, estratégias e estrutura da dissertação.
- O **Capítulo 1** apresenta a revisão bibliográfica e algumas noções gerais acerca do tema, para um melhor enquadramento do leitor ao trabalho apresentado nesta dissertação.
- O procedimento experimental realizado ao longo do trabalho, bem como as técnicas de caracterização utilizadas são descritos no **Capítulo 2**.
- No **Capítulo 3** são apresentados os resultados obtidos e a discussão dos mesmos.
- Por fim, no **Capítulo 4**, são apresentadas conclusões finais retiradas deste trabalho e sugestões a considerar para trabalhos futuros.

Capítulo 1

Revisão bibliográfica

1. Revisão Bibliográfica

1.1. O Osso

O sistema esquelético, constituído por 206 ossos de diferentes formas e tamanhos, tem como principal função conferir suporte e proteção aos órgãos vitais do corpo. Além disso, apoia os músculos, possibilitando os movimentos do corpo e a amplificação das forças geradas na contração muscular.²² Para além de fornecerem suporte e proteção, os ossos são uma fonte de iões inorgânicos, que participam na homeostasia do organismo, e são também um importante reservatório de fatores de crescimento, libertados de forma controlada.²² As principais propriedades do osso são a rigidez, a dureza, poder de regeneração e de reparação.²²

1.1.1. Macroestrutura do osso

Macroscopicamente os ossos podem ser classificados em ossos longos ou ossos curtos, ossos achatados ou ossos irregulares. Por exemplo, é possível ver na Figura 1 o esquema de um osso longo. Podem ser divididos numa região cilíndrica central, a diáfise, e duas extremidades circulares, as epífises. A recobrir as epífises encontra-se uma cartilagem articular que permite uma maior mobilidade entre as superfícies ósseas.²³

A morfologia do tecido ósseo varia com a região do esqueleto em que se encontra, podendo ser porosa, denominada de osso trabecular ou esponjoso, ou compacta, denominada por osso cortical. O osso cortical constitui 80% do esqueleto humano, e é um material que rodeia a zona medular que apresenta uma grande dureza e elevada densidade, e conseqüentemente, uma baixa porosidade. Organiza-se em forma de lâminas concêntricas alinhadas na direção longitudinal do osso, os denominados ósteons (Figura 1 – Osso, Estrutura do tecido). O osso trabecular, que constitui 20% do esqueleto, é predominantemente encontrado nas extremidades dos ossos longos e na estrutura interna de certos ossos, protegido por uma camada de osso cortical (Figura 1 – Osso, Estrutura do tecido).²⁴ Este osso está situado na região interior do osso, apresenta cavidades delimitadas por trabéculas de tecido ósseo, ou seja, é uma matriz porosa. É um material menos denso, mais fraco e menos rígido e mais elástico que o osso cortical. Contudo, a sua área superficial é maior. Funcionalmente, o osso trabecular promove funções metabólicas,

enquanto o osso cortical promove funções de proteção, sendo que ambos têm a função de suporte.²⁵

As superfícies do osso são recobertas por membranas de tecidos conjuntivos, o periósteo e o endósteo. O periósteo cobre a superfície externa do osso, exceto as articulações que são protegidas pela cartilagem articular, enquanto o endósteo reveste a superfície da cavidade medular dos ossos longos (Figura 1 - Estrutura do tecido). A principal função destes tecidos consiste na nutrição e fornecimento de novos osteoblastos para o crescimento e regeneração do osso.²⁶



Figura 1 – Estrutura e constituição do osso. Adaptado de: (Sadat-shojai *et al.*, 2013)²⁷.

1.1.2. Microestrutura do osso

Os tecidos ósseos são compostos por células e por uma matriz com uma componente orgânica e uma inorgânica. As células que constituem os tecidos ósseos são os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos.²⁷

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese de componentes orgânicos da matriz óssea, e depois de desempenhada a sua função a sua maioria desaparece por um processo de morte celular programada. Contudo parte destes ficam “aprisionados” na matriz que sintetizaram, ficando inativos e convertendo-se assim em osteócitos. Os osteócitos desempenham uma função importante na formação de osso, manutenção da qualidade da matriz óssea e na

nutrição do osso. Eles também regulam a resposta do osso quando sujeitos a forças mecânicas. Já os osteoclastos são células fagocitárias responsáveis pela reabsorção do osso por ataque químico e enzimático sendo importantes, juntamente com os osteoblastos, na remodelação constante do tecido ósseo. Este processo contínuo de remodelação envolve a reabsorção óssea por parte dos osteoclastos e formação de novos tecidos ósseos pelos osteoblastos.²⁷

A componente orgânica é principalmente composta por colagénio e representa aproximadamente 30% da composição do tecido ósseo (Figura 1 - microestrutura). A componente orgânica do osso tem como função dar flexibilidade e resiliência ao osso. A componente inorgânica, responsável pela resistência mecânica e rigidez do osso, é constituída essencialmente por cristais de hidroxiapatite (HA), que apresenta a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, representando aproximadamente 70% da composição do tecido ósseo (Figura 1 - nanoestrutura).²⁴

1.1.3. Propriedades mecânicas

Devido ao facto do osso ser um tecido altamente adaptável, as suas propriedades mecânicas variam com o indivíduo (idade, estado), a sua localização no esqueleto, a direção da carga aplicada (longitudinal, transversal) e a velocidade com que esta é aplicada, bem como com o tipo de força (compressão, corte, tração). O facto do osso ser constituído por várias substâncias orgânicas e inorgânicas, torna-o um material mecanicamente anisotrópico. Tais factos justificam a diversidade de valores encontrados na literatura.²⁸

A resistência máxima que o osso consegue suportar observa-se principalmente ao longo do seu eixo longitudinal, que se encontra paralelo ao eixo das fibras de colagénio e dos cristais minerais. Os cristais de HA conferem uma grande capacidade de resistência à compressão, enquanto as fibras de colagénio resistem às forças de tração. Embora o osso seja rígido, este exhibe um grau considerável de elasticidade, o que é importante na sua capacidade em suportar cargas. As forças *in vivo* a que os ossos são submetidos têm várias origens possíveis, tais como as cargas exercidas durante a marcha ou as forças de impacto devido a uma queda.^{28,29} A Tabela 1 resume algumas propriedades mecânicas e porosidade entre os dois tipos de osso, osso cortical e osso trabecular.^{30–32}

Tabela 1 - Propriedades mecânicas e porosidade do osso.

Tipo de osso	Resistência mecânica à compressão (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Porosidade (%)
Osso cortical	100-230	12-18	5-13
Osso esponjoso	2-12	0.05-0.5	30-90

1.1.4. Remodelação e regeneração óssea

A remodelação óssea envolve a remoção do tecido ósseo antigo e a formação de um novo tecido através dos osteoclastos e dos osteoblastos. Tal processo, permite que o osso se adapte às mudanças dos esforços mecânicos a que está sujeito, prevenindo a regeneração óssea, e desta maneira confere-lhe a capacidade de se autorregenerar em casos de pequenas fraturas. Além disso, este processo regula a concentração de iões (especialmente de cálcio) nos fluidos biológicos.²²

O processo de remodelação óssea pode ser dividido nas seguintes fases (Figura 2): quiescência, ativação, reabsorção, formação e mineralização.

- **Fase quiescente:** fase em que o osso está em repouso;
- **Fase de ativação:** ativação da superfície óssea antes da reabsorção, através da retração das células de revestimento ósseo (lining cells) e a digestão da membrana endóstia. A superfície mineralizada atrai os osteoclastos provenientes dos vasos que se encontram próximos;
- **Fase de reabsorção:** os osteoclastos aderem à superfície do osso e começam a dissolver a matriz mineral, através da libertação de enzimas e secreções ácidas;
- **Fase de formação:** nas áreas de reabsorção, vão-se acumulando osteoblastos, atraídos pelos vários fatores de crescimento armazenados na matriz. Estes produzem a nova matriz óssea, inicialmente não calcificada (osteóide) que vai preenchendo as áreas reabsorvidas;

- **Fase de mineralização:** esta fase começa 30 dias após a deposição do osteóide, terminando ao fim de 90 dias no osso esponjoso e 130 dias no osso cortical. A fase de quiescência começa novamente após a fase de mineralização, até haver uma nova fase de ativação.³³

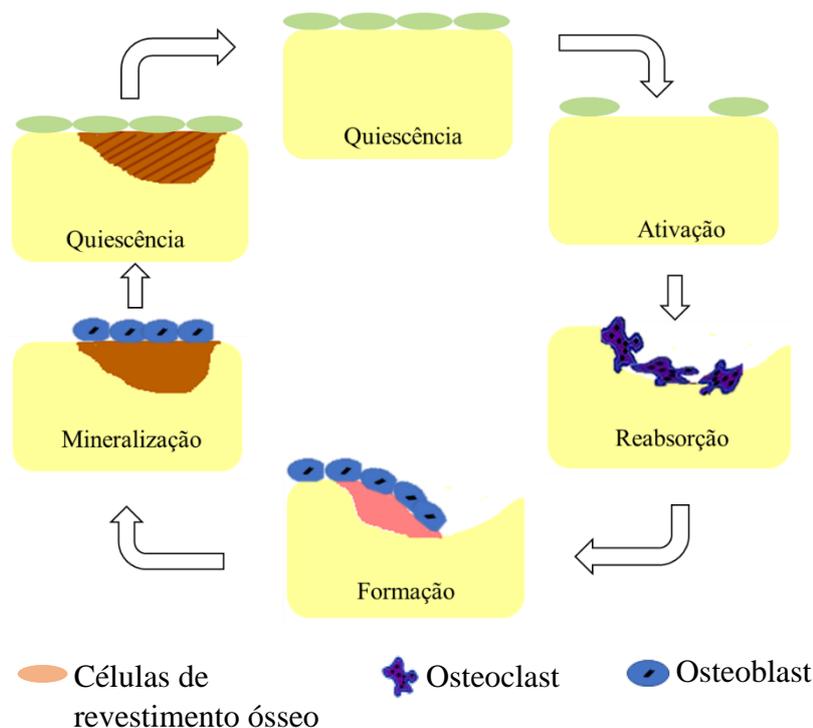


Figura 2- Processo de remodelação óssea. Adaptado de: (Oryan *et al.*, 2014)³⁴.

A regeneração óssea é um processo fisiológico complexo e bem definido de formação óssea, que está envolvido na remodelação contínua durante a vida adulta e pode ser observado durante a cicatrização normal de uma fratura.² Este processo é composto por uma série bem orquestrada de eventos biológicos de indução e condução óssea, para otimizar a reparação esquelética e restaurar a sua função. Eventos como a osteogênese, osteoindução, osteocondução e osteointegração são necessários na regeneração óssea, daí a necessidade de os enxertos ósseos terem todas estas características. A osteogênese é a capacidade de produzir novo tecido ósseo a partir dos osteoblastos por diferenciação das células osteoprogenitoras presentes no osso ou provenientes do material do enxerto.³⁴ A osteoindução é um processo que está diretamente relacionado com qualquer tipo de cicatrização óssea, induzindo a osteogênese. Este procedimento implica o recrutamento de

células imaturas e a estimulação das mesmas para se desenvolverem em pré-osteoblastos. A osteocondução é um fenómeno onde o osso cresce numa superfície ou entre os poros, que é o que acontece em muitos dos implantes ósseos e a osteointegração é o fenómeno que permite a ancoragem estável entre o osso e um implante.³⁵

Ao haver um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação de novo tecido ósseo, é de esperar uma remodelação incorreta, o que pode levar a uma má condição patológica. Além disso, e apesar de os tecidos ósseos ao contrário de outros tecidos, terem a sua própria capacidade de regenerar e reparar, existem condições em cirurgia ortopédica nas quais é necessária a regeneração do osso em grande quantidade (para além do potencial de autorregeneração). Se o defeito exceder o tamanho crítico (1 cm³) o processo regenerativo está comprometido, pois o processo de reparação é mais exigente o que leva à falha da cicatrização e da reparação, formando-se tecido fibroso em vez de osso no local do defeito.^{3,4} Como forma de prevenir isso é necessário utilizar um substituto ósseo no local do defeito, estimulando-se assim a osteogénese ou mesmo acelerando o processo de cicatrização dos tecidos.

1.1.5. Tumores ósseos

Os tumores ósseos podem ser classificados em benignos (não cancerígenos) ou malignos (cancerígenos). Ambos os tumores, podem crescer e comprimir os tecidos saudáveis, contudo, os benignos não se espalham e não afetam o tecido ósseo.³⁶ O tumor ósseo maligno, o denominado “cancro”, consiste num processo onde há desregulação das vias de sinalização celular, o que leva a um crescimento anormal por parte das células, formando assim os tumores. O descontrolo da proliferação celular e a posterior invasão de tecidos constitui a principal característica desta doença, levando a grandes defeitos ósseos ou mesmo à morte do indivíduo em muitos casos (Figura 3).³⁷

Os principais tipos de tumores que afetam os ossos são, o osteossarcoma (maligno), que surge do osteóide no osso e ocorre com mais frequência no joelho e no braço, o condrossarcoma (benigno), que tem origem no tecido cartilaginoso e ocorre com mais frequência na pélvis, e a família de tumores do sarcoma de Ewing (maligno), que geralmente ocorre no osso, mas pode surgir em tecidos moles, e ocorre com mais frequência na coluna vertebral, pélvis, pernas e braços.^{36,38} No entanto, os tipos de tumores

que aparecem nas pessoas variam com o gênero, idade, genética, fatores ambientais e o estilo de vida.³⁷

Atualmente, os principais tratamentos usados para os tumores ósseos envolvem métodos invasivos, como a quimioterapia, radioterapia e cirurgias para remoção do tumor. Porém, estas técnicas possuem desvantagens, pois apresentam efeitos secundários indesejáveis, e as operações cirúrgicas ainda são bastante limitadas devido à dificuldade de se eliminar por completo as células tumorais. Para além disso, os tratamentos não são totalmente efetivos, visto que, muitos dos fármacos usados no tratamento do cancro também afetam as células saudáveis.^{37,39} Posto isto, o desenvolvimento de dispositivos de forma a erradicar os tumores e, simultaneamente, tratar os defeitos ósseos, e capaz de libertar fármaco de uma maneira específica e direcionada seria uma mais-valia à saúde humana.

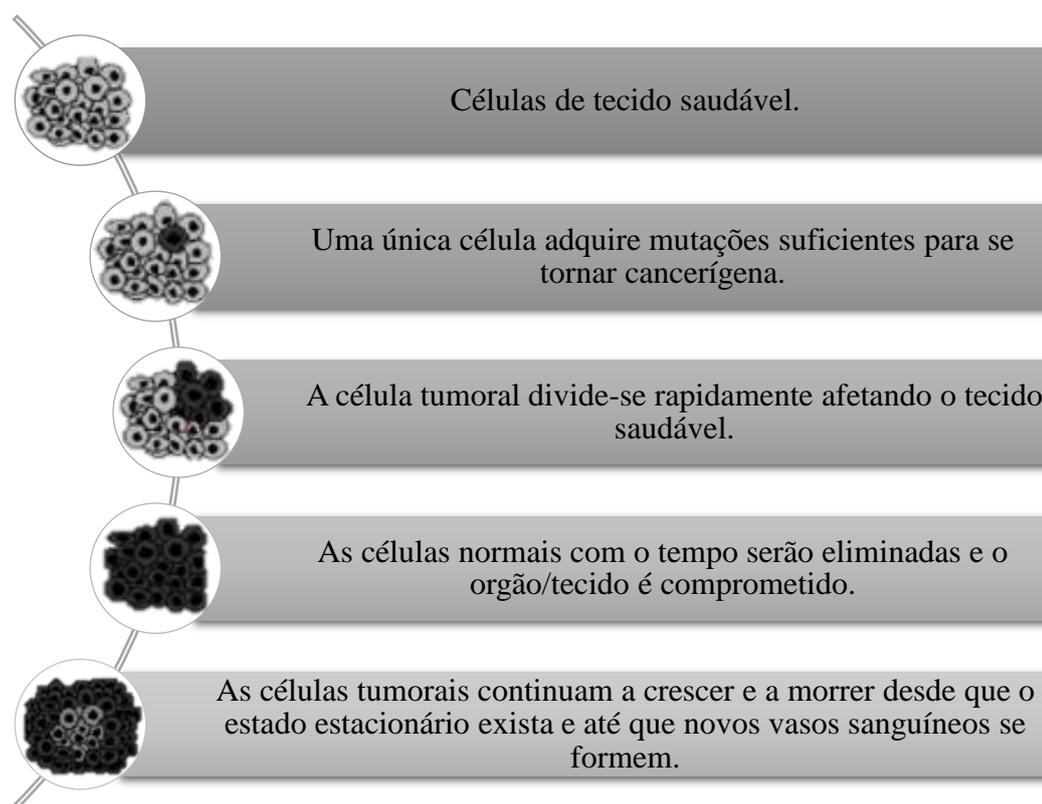


Figura 3 - Desenvolvimento de um tumor. Adaptado de: (Campbell *et al.*, 2007)¹⁸.

1.2. Estratégias para regeneração de tecido ósseo

Com o intuito de regenerar tecidos ósseos danificados e recuperar a sua função anatômica, têm sido desenvolvidas estratégias diferentes, tendo como objetivo a melhoria do processo de regeneração óssea.

Quando é necessário a utilização de dispositivos de substituição física, recorre-se à utilização de estruturas que têm como função a substituição total ou parcial de uma parte anatômica, como é o caso das próteses. Para tratamentos baseados em preenchimento ósseo, de modo a promover o crescimento ósseo e levar à cicatrização do tecido, recorre-se a enxertos.⁴⁰ Os enxertos ósseos autólogos (tecido do próprio indivíduo) são o “padrão-ouro” no tratamento de defeitos ósseos por combinarem todas as propriedades requeridas para a regeneração, tal como a osteoindução, a osteogénese e a osteocondução. Apesar de os autoenxertos possuírem todas as necessidades indispensáveis ao tratamento, eles podem levar à morbidade local, a infeções e hematomas.⁴⁰ Os aloenxertos (tecido de um dador de espécie igual) são uma alternativa aos autoenxertos, contudo esta opção apresenta limitações devido ao facto de estarem associados ao risco de infeções e/ou transmissão de doenças, rejeição e reabsorção.⁴⁰ Os xenoenxertos são outra alternativa para os enxertos autólogos. Os xenoenxertos são retirados de um indivíduo e colocados num indivíduo de espécie diferente. Os mais comuns são os de origem bovina, suína e coral. No entanto, os produtos de origem bovina podem transmitir doenças e infeções. Tanto os xenoenxertos como os aloenxertos perdem as suas propriedades osteogénicas e parte das propriedades osteoindutoras durante o seu processamento.¹

Desde o aparecimento da engenharia de tecidos, em meados de 1980, que esta área tem vindo a evoluir continuamente com o objetivo de estabelecer a estrutura e a função de um defeito.⁴¹ Atualmente as estratégias de engenharia de tecidos dividem-se em três abordagens diferentes identificadas de forma a promover a regeneração óssea (Figura 4). Na primeira abordagem apenas são utilizadas células osteogénicas, implantadas na zona do tecido danificado. O objetivo é autorregenerar o tecido danificado através do implante de um dador, do próprio paciente ou substituição de células progenitoras diretamente no tecido danificado. Este processo evita complicações cirúrgicas e permite a expansão de células em cultura celular, contudo pode haver falhas devido à rejeição imunológica ou por morte das células transplantadas, face à ausência de uma estrutura que replique as funções

da matriz extracelular.^{42,43} A segunda abordagem consiste na implantação direta de um *scaffold* poroso sem utilização de células incorporadas. Este *scaffold* irá servir como suporte estrutural que irá promover a adesão e proliferação celular, e consequente crescimento do tecido.^{42,43} A terceira abordagem também recorre à utilização de *scaffolds* porosos, no entanto neste processo células progenitoras são transplantadas, expandidas em cultura celular e incorporadas no *scaffold*. As células incorporadas vão aderir, proliferar progressivamente na matriz extracelular ao mesmo tempo que o *scaffold* se degrada. Esta última abordagem apresenta melhores resultados que as duas anteriores, em termos de regeneração e cicatrização do defeito.^{42,43}

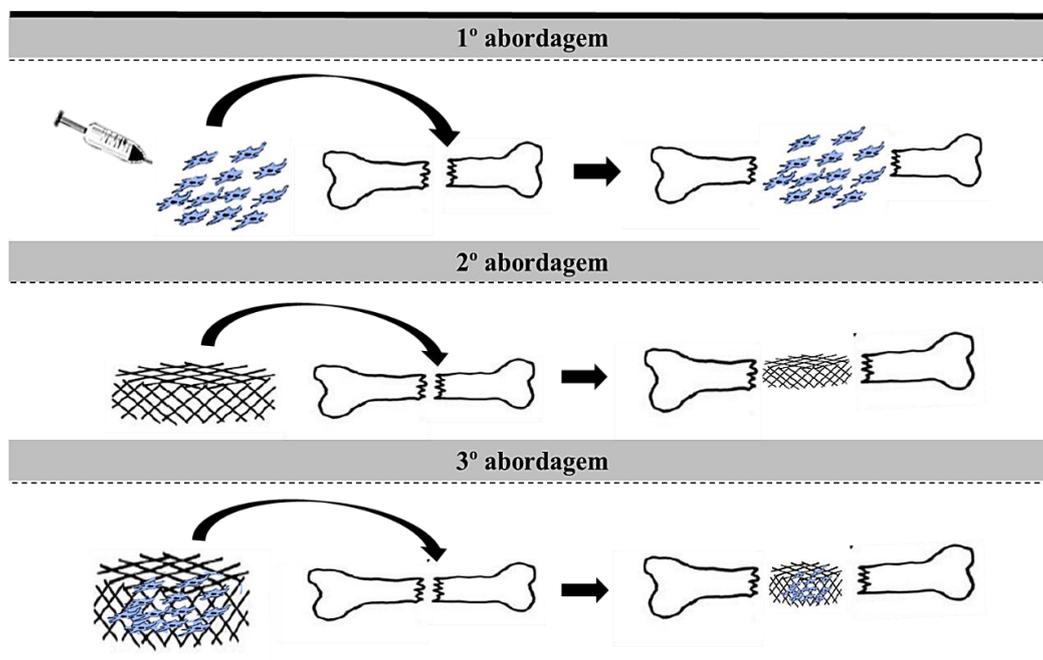


Figura 4 - Esquema das três abordagens principais da engenharia de tecidos que podem ser usadas para regenerar defeitos nos tecidos ósseos. Adaptado de: (Hess *et al.*, 2017) ⁶.

1.2.1. *Scaffolds* como substitutos ósseos

Devido às limitações que os enxertos ósseos anteriormente mencionados apresentam, o desenvolvimento de substitutos ósseos sintéticos porosos e biodegradáveis, que promovem a adesão e proliferação celular, tem vindo a ganhar cada vez mais interesse nos últimos anos. Os *scaffolds* são estruturas que apresentam tais características. Um *scaffold* é uma estrutura porosa 3D que tem um papel importante na regeneração óssea, pois este material

proporciona a adesão, proliferação e diferenciação celular e a produção de matriz extracelular, com consequente crescimento ósseo, até que o novo tecido seja completamente restaurado/regenerado.⁴²

Para que ocorra uma boa formação óssea, o *scaffold* ideal deve possuir determinadas características e propriedades, tais como ^{1,44,45}:

- Fornecer uma estrutura 3D temporária, que imite as funções fisiológicas da matriz extracelular original e estimule o crescimento dos tecidos;
- Elevada biocompatibilidade, isto é, capacidade de suportar a atividade celular normal sem provocar qualquer efeito nocivo nos tecidos;
- Incentivar a adesão, proliferação e diferenciação celular, bem como a adsorção dos metabólitos biológicos;
- Promover a ligação ao tecido hospedeiro sem a formação de um tecido cicatricial;
- Taxa de degradação semelhante à da formação de novo osso, de tal modo que no momento em que o local de adesão esteja totalmente regenerado, o *scaffold* deva estar totalmente degradado. Além disso, o material de degradação não deve ser tóxico;
- Superfície porosa e com poros interconectados, com tamanhos de poro pelo menos de 100 µm, para facilitar o crescimento do tecido, angiogênese e um fluxo eficaz de nutrientes. Tamanhos de poros entre 200-900 µm têm-se mostrado mais adequados para o uso na engenharia do tecido ósseo;
- Possuir propriedades mecânicas semelhantes às do osso saudável, com capacidade de suportar cargas e transferir as mesmas, gradualmente, para os tecidos vizinhos, para se evitar falhas após a sua implantação;
- Ser esterilizável e cumprir os requisitos legais para utilização clínica;
- Ser conformável por técnicas de processamento capazes de produzir o *scaffold* de acordo com a geometria do defeito do osso do paciente.

Tanto o material que constitui o *scaffold* como a sua estrutura (superfície, porosidade, e interconectividade de poros) desempenham um papel importante na regeneração de tecidos. Num *scaffold* é necessário haver um compromisso entre a sua densidade e porosidade, pois embora as propriedades mecânicas sejam melhores num *scaffold* mais

denso, é a sua porosidade que fornece uma melhor taxa de adesão e incentiva a uma boa proliferação celular.⁴⁶

As propriedades mecânicas, tal como a taxa e a extensão da regeneração variam muito com os materiais a partir do qual é feito o *scaffold*, pela sua arquitetura e porosidade, sendo também influenciadas pelo estado e pelo ambiente mecânico do local onde é colocado. Se a morfologia e a dimensão do defeito forem extensas e críticas, isso colocará em causa o mecanismo regenerativo. Muitos estudos *in vivo* demonstram o papel importante da sensibilidade mecânica do tecido ósseo e a interação entre os biomateriais e os ossos. A estabilidade mecânica e o potencial biológico do osso e os tecidos circundantes são bastante cruciais para a regeneração óssea e a cicatrização de fraturas, pelo que basta uma única mudança num destes fatores para afetar diretamente o resultado final.⁴⁶

1.3. Biomateriais utilizados em *scaffolds*

Para a produção de um *scaffold* a escolha do material ou materiais a utilizar é importante, uma vez que as suas propriedades irão determinar, em grande parte, o desempenho do *scaffold*.

Os biomateriais utilizados como *scaffolds* para a regeneração óssea podem ter origem sintética ou natural. Embora os materiais naturais apresentem vantagens em termos de biocompatibilidade mecânica e estrutural com os tecidos, tem existido um enorme interesse pelo desenvolvimento dos materiais sintéticos, pelo facto de serem mais fáceis de produzir e por terem uma microestrutura controlada.⁴²

De acordo com a resposta do tecido hospedeiro, os materiais podem ser classificados segundo o seu comportamento biológico: bioinertes - não há interações químicas com o tecido, o que não provoca reações estranhas no organismo do paciente (titânio, zircónia e alumina); bioativos - ocorre interações com os tecidos vivos, pois normalmente têm, na sua composição, íões de cálcio e/ou fósforo (no casos dos substitutos ósseos) que vão estabelecer uma ligação química com o osso envolvente (hidroxiapatite, vidros bioativos); reabsorvíveis - materiais que se degradam lentamente e possibilitam que as células saudáveis cresçam e substituam a matriz que o constitui (fosfato tricálcico, vidros bioactivos).⁴⁷

Nos implantes biodegradáveis é necessário ter em conta as propriedades de manuseamento, as capacidades osteocondutoras e osteoindutoras, a taxa de degradação e, dependendo do local, as propriedades mecânicas. A taxa de degradação está ligada com a porosidade do material. Um aumento da porosidade leva geralmente a um aumento da área superficial exposta ao meio envolvente, podendo ocorrer a dissolução e/ou degradação mediada pelas células e enzimas, levando assim a um aumento da taxa de degradação.²⁶

Atualmente, utilizam-se biomateriais de natureza muito variada para o fabrico de *scaffolds*, incluindo uma variedade de cerâmicos e polímeros. Seja quais forem os materiais utilizados em *scaffolds* para regeneração óssea, estes devem apresentar capacidades osteoindutoras, osteocondutoras e de osteointegração.⁴² Materiais como o colagénio, hidroxiapatite (HA), β - fosfato tricálcio (β -TCP), cimentos de fosfato de cálcio, o ácido poliláctico (PLA), o ácido poliglicólico (PGA), quitosano (CH), fibroína, biovidros, entre outros, são exemplos de alguns materiais utilizados.⁴⁸ Os biopolímeros têm vindo a ser bastante usados para a produção de *scaffolds*, como é o caso, da policaprolactona (PCL) e o do poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA).^{10,11} Contudo, os *scaffolds* à base de polímeros apresentaram algumas desvantagens devido às suas propriedades hidrofóbicas, dificuldade em controlar a libertação de fármacos e também devido às suas baixas propriedades osteocondutivas.¹² Por esse motivo, os fosfatos de cálcio continuam a ser a melhor escolha para reparação de defeitos ósseos, uma vez que a sua parte mineral é idêntica à do osso (cálcio e fósforo), e para além disso, apresentam elevada biocompatibilidade, propriedades osteoindutivas e osteocondutivas.^{13,14}

Neste trabalho serão focados apenas materiais cerâmicos da família dos fosfatos de cálcio, nomeadamente o β -fosfato tricálcio (β -TCP) e hidroxiapatite (HA), e a mistura destes com polímeros formando compósitos.

1.3.1. Fosfatos de cálcio

Uma fonte de cálcio e fósforo é crucial durante a regeneração óssea, e por esse motivo, os cerâmicos pertencentes à família dos fosfatos de cálcio (CaPs) têm vindo a ser bastante utilizados como substitutos ósseos, revestimento, cimentos e sistemas de libertação de fármacos devido à sua similaridade química com a parte inorgânica da matriz óssea, o que permite uma boa ligação com as células.⁴⁹

Estes biomateriais são considerados bioativos devido à sua interação ativa com as superfícies ósseas durante a regeneração óssea, permitindo assim a osteointegração que é importante na regeneração do tecido ósseo à medida que o osso sofre uma remodelação dinâmica do tecido durante o processo de regeneração.⁵⁰ A biocompatibilidade, bem como propriedades osteocondutoras e osteoindutivas destes materiais foram bem documentadas, tornando-se assim os materiais porosos mais comumente usados em *scaffolds*.^{13,14,51,52}

Uma das propriedades mais importantes destes materiais é, provavelmente a solubilidade, pois o seu comportamento *in vivo* pode ser previsto em grande medida pela solubilidade. Se a solubilidade do CaP é menor que a parte mineral do osso, este irá degradar-se mais lentamente, no entanto, se for maior à do osso, o CaP é mais rapidamente degradado.⁵³ Outra propriedade importante é o comportamento mecânico que os CaPs apresentam, pois, esta influencia fortemente as suas aplicações como implantes. A tensão, a resistência à compressão e a resistência à fadiga dependem do volume total de porosidade, que se pode encontrar sob a forma de microporos ou macroporos. Além disso, sendo materiais cerâmicos, os CaPs apresentam uma dureza elevada e um comportamento frágil, o que pode influenciar na sua aplicabilidade.⁵⁴

A reabsorção ou a biodegradação dos CaPs é causada pelos seguintes fatores:⁵⁴

- **Dissolução físico-química**, que depende da solubilidade do material e do pH do meio, havendo a possibilidade de se formar novas fases à superfície;
- **Desintegração física**, levando à formação de pequenas partículas como resultado de um ataque químico nas fronteiras de grão;
- **Fatores biológicos**, como a fagocitose, que causam uma redução do pH do meio, causando a degradação dos CaPs.

Na Tabela 2 são apresentados os CaPs mais comuns.

Tabela 2 - Fosfatos de cálcio mais comuns. Adaptado de: (Dorozhkin *et al.*, 2011) ⁵⁵.

<u>Designação</u>	<u>Fórmula química</u>	<u>Ca/P</u>
Fosfato monocálcico monoidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Fosfato monocálcico anidro	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5
Fosfato dicálcico diidratado ou brushite	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1
Fosfato dicálcico anidro ou monetite	CaHPO_4	1
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato de cálcio amorfo	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,2 - 2,2
α-fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
β-fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hidroxiapatite deficiente em cálcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ $0 < x \leq 1$	1,5 – 1,67
Hidroxiapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2

O CaP mais produzido e menos dispendioso na indústria continua a ser a hidroxiapatite (HA). O fosfato tricálcico também está disponível em grande escala na indústria e é provavelmente o material bioreabsorvível mais utilizado.⁴⁷ Este material existe à temperatura ambiente sob duas formas cristalinas alotrópicas α e β , como se pode verificar pela Tabela 1, sendo a fase β a abordada neste trabalho.

➤ β - Fosfato tricálcico

O β -fosfato tricálcico (β -TCP), com uma estrutura cristalina romboédrica, tem sido amplamente utilizado na substituição e na regeneração do tecido ósseo, sob várias formas de *scaffolds*, em cimentos ósseos ou como reforço de *scaffolds* poliméricos. O β -TCP é bioativo e biocompatível, sendo completamente absorvido pelo organismo num intervalo de tempo de 1 a 2 anos.⁴⁷

A forma β pode ser obtida por calcinação a 700-800 °C de apatites deficientes em Ca, com perda de água, de acordo com a reação:⁴⁷



O β -TCP, fase de baixa temperatura, é estável desde a temperatura ambiente até 1125 °C, podendo também ser estabilizado pela presença de pequenas quantidades de impurezas iônicas, como os íons Mg^{2+} , frequentemente associados aos sais de cálcio.⁴⁷ Numa gama de temperaturas entre 1125 °C a 1430 °C, ele transforma-se na fase α -TCP que pode ser mantida à temperatura ambiente como fase metastável.²⁶

Este material apresenta velocidades de solubilidade muito maiores no organismo que a HA. Esta velocidade de absorção não coincide com a velocidade de formação do osso, o que leva a problemas na sua aplicação como material puro. É importante que a velocidade de degradação do material se adeque à formação do osso, visto que uma taxa de degradação lenta pode resultar na sua persistência no corpo durante mais tempo, e uma velocidade demasiado rápida não assegura a integridade mecânica do substituto em tempo suficiente para cumprir o seu objetivo.⁵⁶

➤ Hidroxiapatite

A hidroxiapatite é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. A sua fórmula estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com uma razão Ca/P de 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. Ao contrário do β -TCP, a velocidade de degradação em contacto com os fluidos corporais é baixa, fazendo com que se mantenha no organismo durante anos.⁵⁷

A obtenção deste material pode ser por precipitação (HAp) ou a altas temperaturas (HA). Ambos os métodos de obtenção, não irão alterar a estrutura cristalina, ou seja, são hexagonais, contudo as propriedades são alteradas, como por exemplo, as propriedades mecânicas. Por norma a HAp é não estequiométrica ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$), sendo obtida a partir de soluções que contêm íons de cálcio e fósforo numa razão Ca/P=1,67, a $\text{pH}>9$, mantendo-se o precipitado sob condições apropriadas. No entanto, esta pode ter uma razão molar de Ca/P entre 1,50-1,67, chamada de hidroxiapatite deficiente em cálcio ou fosfato tricálcico (TCP).^{47,57}

A HAp comparada com a HA, é geralmente pouco cristalina e com um tamanho de cristais pequenos e apresenta, normalmente, uma área superficial superior à da HA, o que faz com

que seja mais reativa em termos bioquímicos. Para além disso, a HAp apresenta sempre, tal como a apatite biológica, um certo grau de substituição por outros iões.^{47,57}

A hidroxiapatite sintética é considerada uma opção para substituição óssea, pois trata-se de um material biocompatível, osteocondutor e bioativo, o que a torna um bom material para promover a formação de novos tecidos ósseos.⁵⁷

➤ Fosfatos de Cálcio Bifásicos

Um biocerâmico completamente reabsorvível tem sido o objetivo de vários estudos. Contudo, um material com uma taxa de reabsorção demasiado rápida pode interferir na formação óssea, pois o biomaterial pode degradar mais rápido do que a formação do osso. Além disso, a libertação de altas concentrações de cálcio num curto intervalo de tempo resulta numa mudança de pH no ambiente, o que pode levar a uma resposta inflamatória e à formação de tecido fibroso. Consequentemente, um CaP com uma taxa de reabsorção menor necessita de ser estável por um período de tempo suficiente para permitir a formação dos tecidos ósseos, de modo a que não resulte na sua persistência no corpo mais tempo do que o necessário.⁴⁹

Como visto anteriormente, o β -TCP e a HA apresentam taxas de reabsorção diferentes. A HA tem uma taxa de reabsorção mais lenta, enquanto o β -TCP apresenta uma taxa de reabsorção mais rápida. Devido a estas diferenças, surgiu o interesse de se usar os dois materiais em conjunto: (1) por misturas de pós de HA com β -TCP, com razões controladas ou (2) por uso de pós bifásicos (BCP) que podem ser sintetizados por vários métodos, sendo a precipitação química uma das mais usadas^{51,58,59}, obtendo-se materiais de fosfatos de cálcio bifásicos, desenvolvidos para controlar melhor a bioatividade e o processo de reabsorção durante a substituição óssea, tornando-os desta forma mais versáteis em comparação com outros CaPs e mesmo aos seus componentes individuais.⁴⁹

1.3.1.1. Substituição iónica em fosfatos de cálcio

A parte mineral do osso é semelhante à HA, tendo na sua composição outros elementos químicos que desempenham um papel importante nos processos biológicos, pelo que a dopagem de CaPs com estes elementos tem sido alvo de interesse por parte da comunidade

científica. A dopagem consiste numa substituição iônica na estrutura molecular dos CaPs e ocorre normalmente de forma catiónica.

Devido ao seu interesse biológico, a incorporação de íons em fosfatos de cálcio sintéticos, tais como, Mg, Sr, Zn, Na, K, entre outros tem despertado muito interesse. O magnésio (Mg) tem um papel chave no metabolismo mineral do osso, uma vez que influencia a atividade dos osteoblastos.^{60,61} O estrôncio tem efeitos benéficos no tratamento da osteoporose devido à prevenção da perda óssea e manutenção de inibição da reabsorção óssea e manutenção da formação óssea.⁶⁰ O sódio tem uma função importante na adesão celular e nos processos do metabolismo e reabsorção óssea. O zinco tem um papel importante no processo de regeneração óssea, pois promove a proliferação e diferenciação dos osteoblastos.⁶⁰ O potássio é um elemento responsável pela regulação do processo bioquímico e importante no processo de nucleação da apatite natural.⁶⁰ A presença de íons “estranhos” na estrutura de fosfatos de cálcio sintéticos pode alterar as suas propriedades físico-químicas e biológicas, como por exemplo, os parâmetros de rede, solubilidade, cristalinidade, reabsorção óssea, bioatividade, entre outros.⁶²⁻⁶⁷ Sobre esta perspectiva, a incorporação de íons tem sido e continua a ser alvo de muitos estudos, com o principal objetivo de sintetizar fosfatos de cálcio com propriedades melhoradas.

A dopagem com íons ferro começou a aparecer na literatura recentemente.^{17,68,69} O ferro, é um elemento que representa aproximadamente 35 e 45 mg/kg de peso corporal em mulheres e homens adultos, respetivamente.⁷⁰ É um dos íons metálicos essenciais dos ossos, que participa em processos celulares do organismo humano, tais como, na síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), proteínas, processo de transporte de elétrões, proliferação e diferenciação celular. Sendo este, um elemento coordenador da hemoglobina e mioglobina, torna-se indispensável para o transporte de oxigénio e regulação de vários processos metabólicos.⁷¹ No entanto, devido à sua capacidade de formar radicais livres, a concentração de ferro nos tecidos deve ser moderada, pois em quantidades excessivas pode provocar danos severos nos tecidos.⁷² Além do ferro ser um elemento essencial no organismo humano, é um material que apresenta propriedades magnéticas, o que o torna ainda mais vantajoso na dopagem de CaPs.

O uso de materiais magnéticos é uma grande vantagem no tratamento de defeitos ósseos, causados principalmente por tumores, pois é sabido que estes materiais conseguem melhorar as respostas dos osteoblastos, levando à formação óssea, e ainda serem usados como sistemas de hipertermia para combater o cancro.^{19,73,74} Atualmente são vários os estudos de dopagem de CaPs com íons ferro de forma a produzir materiais com propriedades biológicas e hipertérmicas melhoradas, e de forma a perceber possíveis alterações na estrutura cristalina.^{69,75,76}

Tampieri *et al.*¹⁷, sintetizaram pós de HA dopados com Fe²⁺/Fe³⁺ introduzindo os íons ferro na estrutura cristalina da HA e obtiveram pós com comportamento superparamagnético, e com formação reduzida de magnetite como fase secundária. As medidas de hipertermia, ou seja, a evolução do calor ao longo do tempo de exposição a um campo magnético, mostraram um aumento de temperatura de cerca de 40°C em 60s. Ainda neste trabalho, os autores concluíram que quando aplicado um campo magnético, ocorre um aumento significativo da proliferação celular em comparação com os pós onde não se aplicou nenhum campo magnético.

No trabalho realizado por Singh *et al.* foram sintetizados pós de β-TCP co-dopados com Fe³⁺, por precipitação em meio aquoso, usando quantidades de Ferro entre 2,5 e 12,5 mol%. Os resultados obtidos mostraram que foi possível incorporar 5,02 mol% de Fe³⁺ na rede cristalina do β-TCP, sem aparecimento de fases secundárias. Para quantidades de Ferro de 7.54 mol%, os autores observaram a formação da fase trigonal Ca₉Fe(PO₅)₇ como fase maioritária, com uma pequena quantidade da fase CaFe₃(PO₄)₃O, sendo este pó o que apresentou a melhor resposta magneto-térmica. Todos os pós estudados apresentaram biocompatibilidade, confirmado por testes de citotoxicidade, hemolíticos e Fosfatase Alcalina (ALP).

1.3.2. Compósitos

A combinação de polímeros e cerâmicos no fabrico de *scaffolds* são uma estratégia interessante, visto que o osso já é uma combinação entre um polímero (colagénio) e um material cerâmico (apatite biológica). Portanto, o desenvolvimento de um *scaffold* de polímero e fosfato de cálcio tem como objetivo reter as vantagens de ambos os materiais,

de modo a alcançar o mais próximo possível as propriedades mecânicas e fisiológicas do osso.⁴⁴

Devido às excelentes propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, e antibacterianas do quitosano, e devido à composição química dos CaPs serem semelhantes à componente inorgânica do osso, *scaffolds* compósitos de quitosano/CaP são uma escolha promissora para a engenharia de tecido ósseo. De acordo com Ito et al.⁷⁷ membranas compósitas de quitosano/HAp implantadas na calvária de ratos são biologicamente bem toleradas e promovem a osteogênese. Zhang et al.⁷⁸ comprovaram que com a adição de β -TCP ao quitosano, o módulo de compressão e a tensão de cedência dos *scaffolds* compósitos melhoraram bastante. Além disso, de acordo com Finise et al.⁷⁹ pode ocorrer a reticulação do quitosano na presença de pós de CaP.

Uma outra forma de aumentar a resistência mecânica do quitosano, que por si só é mecanicamente fraco, é a adição de agentes reticulantes à composição do quitosano. Os reticulantes são materiais que permitem a formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas, sendo os dialdeídos (como o glutaraldeído ou o glioxal) e a genipina, os mais usados no caso do quitosano.⁸⁰ No entanto, os dialdeídos são considerados tóxicos, o que aumentou o interesse pelo uso da genipina, pois é mais biocompatível e não apresenta citotoxicidade para as células humanas e animais.^{80,81} A genipina reage com os grupos amina do quitosano, dando origem à sua reticulação (Figura 5).⁸¹

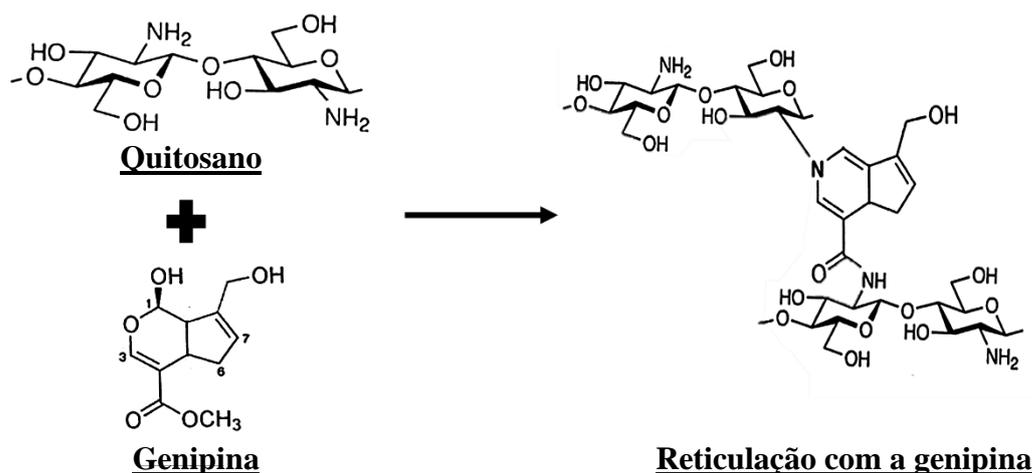


Figura 5 – Reticulação do quitosano pela genipina. Adaptado de: (Bianchi *et al.*, 2015)⁸².

1.4. *Scaffolds* magnéticos como substitutos ósseos

Devido ao fato de o osso ser um material magneto-sensível, foram já utilizados com sucesso estímulos de força mecânica para promover a regeneração óssea. Além dos estímulos mecânicos, a estimulação magnética originada por um campo magnético estático (*Static Magnetic Field*, SMF) também foi explorada para o mesmo efeito. Devido à influência que os campos magnéticos têm na estimulação das células, o interesse pelos biomateriais magnéticos para aplicações em engenharia de tecido ósseo está a ser cada vez maior.⁸²

Atualmente, e segundo a literatura, a obtenção de *scaffolds* magnéticos com propriedades hipertérmicas e mecânicas, funcionais para implantação óssea, é feita por incorporação de nanopartículas magnéticas (NPMs) nos *scaffolds*.^{15,16,83-87} O uso de NPMs à base de óxidos de ferro, maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou magnetite (Fe_3O_4) com um comportamento superparamagnético, também conhecidas por SPIONs, do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticle*, demonstram um elevado potencial para terapias genéticas, administração de bioagentes, hipertermia antitumoral, libertação de fármaco ou como agentes de contraste em imagem de ressonância magnética nuclear (RMN), graças à possibilidade de não reterem qualquer magnetização residual após a remoção do campo magnético.^{3,19,82,86-91} Os *scaffolds* carregados com NPMs podem ser ativados através da aplicação de um campo magnético externo, que irá induzir no sistema um campo com um gradiente magnético que provoca o deslocamento das partículas, produzindo forças de compressão e de tração na membrana da célula, resultando na deformação do citoesqueleto das células.⁸² As forças transmitidas são projetadas para ativar uma série de vias de sinalização intracelular, incluindo alterações nos níveis de cálcio e a “ativação” das proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPK) que irão responder aos estímulos sentidos, levando a uma regulação dos osteócitos e dos osteoblastos, conduzindo, eventualmente, ao desenvolvimento e à função normal do tecido ósseo.⁸² Contudo, os efeitos a longo prazo no corpo humano de NPMs de óxido de ferro ainda não são totalmente conhecidos. Devido à necessidade de usar NPMs sem qualquer tipo de toxicidade, o interesse pelo desenvolvimento de um material com características magnéticas, biocompatível, bioreabsorvível e com uma composição semelhante à do osso

natural, tem vindo a ganhar muito interesse, pois um material com todas estas características garante um resultado eficaz e sem qualquer risco para a saúde.

Na literatura já existem alguns trabalhos que demonstram a aplicação da dopagem de fosfatos de cálcio com iões ferro, de modo a obter pós magnéticos e/ou magneto-térmicos com melhores propriedades regenerativas e que possam simultaneamente ser aplicados em tratamento do cancro por hipertermia.^{17,68,69} O fabrico de *scaffolds* para regeneração óssea partindo de pastas com elevados teores destes pós não foi ainda reportado. De seguida serão apresentados alguns dos estudos realizados para a obtenção de *scaffolds* magnéticos com diferentes materiais.

1.4.1. Estudos Realizados

Nos dias de hoje são vários os materiais utilizados na produção de *scaffolds* magnéticos, estando apresentado na Figura 6 os mais investigados.

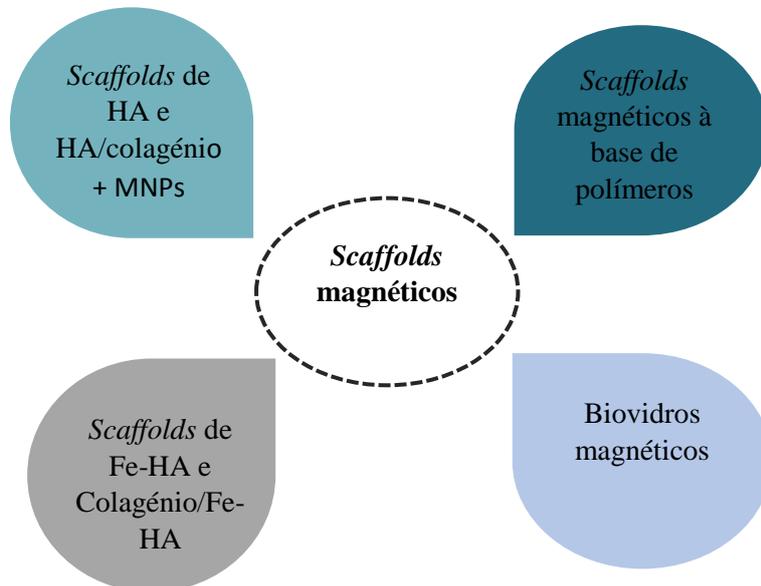


Figura 6 - *Scaffolds magnéticos* mais estudados. Adaptado de: (Zhang *et al.*, 2016)⁸³.

De forma a obter *scaffolds* magnéticos porosos biocompatíveis, Bock *et al.*⁹³ produziram *scaffolds* de colagénio e da mistura HA/colagénio e infiltraram-nos em soluções aquosas de nanopartículas magnéticas. Os autores verificaram que as NPMs foram eficientemente

incorporadas nos *scaffolds*, contudo, houve uma maior incorporação nos *scaffolds* de HA/colagénio do que nos *scaffolds* de colagénio puro. A partir de estudos *in vitro*, foi possível verificar que os *scaffolds* magnéticos apresentavam uma biocompatibilidade adequada.

No trabalho realizado por Zeng *et al.*⁸⁵, foram desenvolvidos *scaffolds* sinterizados de HA, posteriormente magnetizados por imersão em soluções de NPMs de diferentes concentrações (0-2 wt.%). Os resultados demonstraram que os *scaffolds* magnéticos aumentaram a adesão celular, proliferação e diferenciação em relação com o grupo de controlo (não magnéticos). Ao aplicar-se um campo magnético externo, houve um aumento na proliferação celular com o aumento da concentração de NPMs.

Wu *et al.*⁹⁴, fabricaram *scaffolds* sinterizados de HA e de HA/TCP com NPMs, para estudar a capacidade de reparar osso quando aplicado um campo magnético. Para se saber a influência dos materiais magnéticos na expressão da proteína morfológica do osso (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMP), implantou-se BMP-2 em músculos de ratos. Os resultados demonstraram que as amostras apresentam boa biocompatibilidade com as células ósseas. As nanopartículas superparamagnéticas não afetaram a ligação das BMPs aos *scaffolds*. Foi verificado, por fim, que a implantação de *scaffolds* de HA/TCP, NPMs e BMP-2 acelerou a formação de tecido ósseo, quando aplicado um campo magnético.

Em 2011, De Santis *et al.*⁸⁴, produziram *scaffolds* magnéticos de poli(ϵ -caprolactona, PCL), incorporando NPMs de magnetite (Fe_3O_4). A técnica de manufatura aditiva permitiu fabricar *scaffolds* com uma maior precisão e com uma estrutura porosa totalmente interconectada. Os testes de tração realizados em filamentos de PCL e PCL/ Fe_3O_4 , revelaram um comportamento dúctil para ambos. A fase magnética melhorou mecanicamente a matriz de PCL, ou seja, o módulo de elasticidade e a tensão máxima aumentaram de 10% e 30%, respetivamente. A partir das medições magnéticas, viu-se que os *scaffolds* de PCL mostraram um comportamento superparamagnético. Nos ensaios *in vitro*, verificou-se um aumento da adesão e proliferação de células nos *scaffolds* magnéticos, quando comparados com o *scaffold* de PCL puro, o que indica que os *scaffolds* magnéticos apresentam melhor desempenho biológico quando submetidos a um campo magnético.

Wu *et al.*⁹⁵ desenvolveram um *scaffold* multifuncional de vidro bioativo para hipertermia e liberação de fármaco. Para este fim, foram preparados *scaffolds* onde se incorporou 5% e 10% de Fe nos biovidros. A incorporação do Fe na estrutura do biovidro aumentou a atividade mitocondrial e a expressão de genes relacionados com o osso (ALP e OCN), nas células estaminais mesenquimais da medula óssea (*bone marrow mesenchymal stem cells*, BMSC) ligadas aos *scaffolds*. Os *scaffolds* obtidos apresentaram propriedades magnéticas, biodegradabilidade, bioatividade e ainda uma boa capacidade de liberação de fármaco.

1.4.2. Tratamento do cancro por hipertermia

Desde que se descobriu que temperaturas acima da temperatura corporal normal ($\approx 37^{\circ}\text{C}$) são capazes de parar o crescimento tumoral e assim limitar o desenvolvimento do cancro, a indução de calor recebeu uma atenção especial.¹⁸ A hipertermia é um tratamento que tem vindo a ser cada vez mais usado em conjunto com a radioterapia e a quimioterapia. O seu principal objetivo é reduzir as doses quimioterapêuticas ou os níveis de radiação necessários para manter ou mesmo melhorar a eficiência do tratamento.⁹⁶ A hipertermia pode ser local, regional e global (todo o corpo), dependendo da localização da doença. Na hipertermia local apenas uma pequena área de interesse é que é sujeita a calor, sendo por isso a que tem ganho mais atenção pois há menor risco de danificar os tecidos saudáveis.¹⁹ Com a hipertermia local as temperaturas aplicadas então num intervalo de 40°C a 46°C .⁹⁷

Devido à possibilidade de converter a energia magnética em energia térmica, os materiais magnéticos mostraram serem eficazes no tratamento de diversas doenças, incluindo no tratamento de tumores, combinando a cirurgia como tratamento convencional e hipertermia como uma via alternativa de tratamento. O calor que é gerado pelas NPMs quando sujeitas a um campo magnético tem como principal objetivo ter um efeito terapêutico via hipertermia, originando localmente um aumento de temperatura, levando à morte das células tumorais sem danificar as células saudáveis. As partículas que contêm material ferromagnético, como ferro ou óxido de ferro, tipicamente com uma estrutura cristalina de maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou de magnetite (Fe_3O_4), podem ser aquecidas usando campos magnéticos alternados (*Alternating Magnetic Field*, AMF), permitindo o tratamento localizado do cancro devido ao efeito de hipertermia.^{19,96,98}

Para o tratamento de tumores ósseos existem dois passos principais, sendo esta metodologia apresentada por Andronesu et al.⁹⁶ No primeiro passo é necessário uma intervenção cirúrgica para uma remoção do tecido tumoral, enquanto o segundo passo consiste em preencher o defeito ósseo resultante com materiais multifuncionais, de forma a reparar/regenerar e a matar as células cancerígenas residuais (Figura 7).

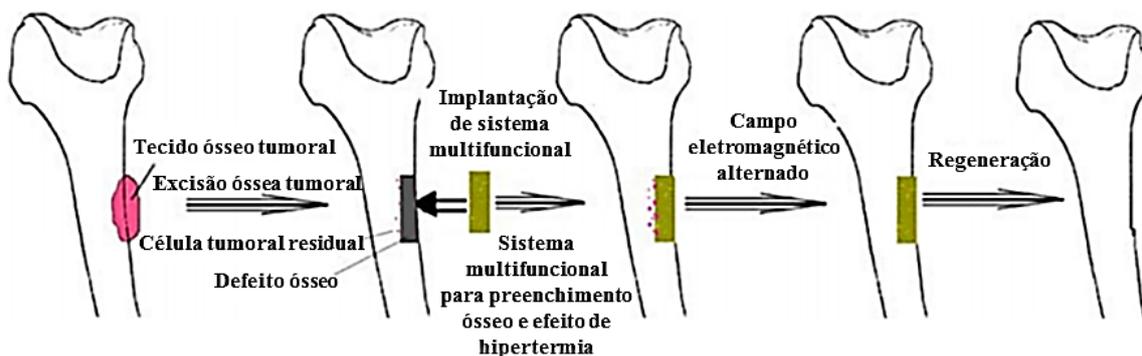


Figura 7 - Tratamento do cancro com ressecção tumoral e posterior efeito hipertérmico. Retirado de: (Marques *et al.*, 2014)⁹⁶.

1.5. Libertação controlada de fármaco

Atualmente, as vias de administração de fármacos mais frequentes são entérica, parentérica e pulmonar. No entanto, a sua administração com sucesso é um desafio, uma vez que se verificam problemas relacionados com o difícil acesso ao local de ação. Na sua origem estão diversos fatores, nomeadamente, o risco de degradação por parte de enzimas, a elevada massa molecular que pode dificultar a absorção para a circulação sistémica, tempos de semivida curtos, entre outros.⁹⁹ Para além disso, é sabido que na administração de um fármaco, a maior parte desse fármaco pode não atingir o tecido alvo, devido à distribuição deste pelos diferentes tecidos.¹⁰⁰ Um outro problema é que a administração de uma grande quantidade de fármaco ao longo de um tempo de administração longo, pode levar a uma resistência ao medicamento por parte das bactérias, assim como, efeitos indesejáveis de toxicidade.¹⁰¹

Nas formas convencionais de administração de fármacos existe um aumento brusco da concentração do fármaco no sangue, atingindo-se um máximo de concentração no plasma,

seguindo-se uma diminuição exponencial, o que obriga a que sejam efetuadas várias administrações para se restabelecer os níveis terapêuticos. Quando a concentração do fármaco no plasma se encontra acima da concentração mínima eficaz do intervalo terapêutico, o fármaco exerce a sua ação terapêutica, mas quando a concentração desce abaixo desse limiar, a sua ação é inútil para o tratamento. Se a concentração do fármaco se encontra acima do limite máximo do intervalo terapêutico torna-se tóxico. Desta maneira torna-se necessário administrar o fármaco várias vezes ao dia, originando variações dos níveis de fármaco no organismo, garantindo-se desta maneira que a concentração do fármaco seja eficaz e não tóxica (valores compreendidos dentro do intervalo terapêutico).¹⁰²

Na Figura 8 é comparado o perfil de concentração de um fármaco após administrações sucessivas com um perfil de administração de fármaco ideal para o tratamento de uma doença.

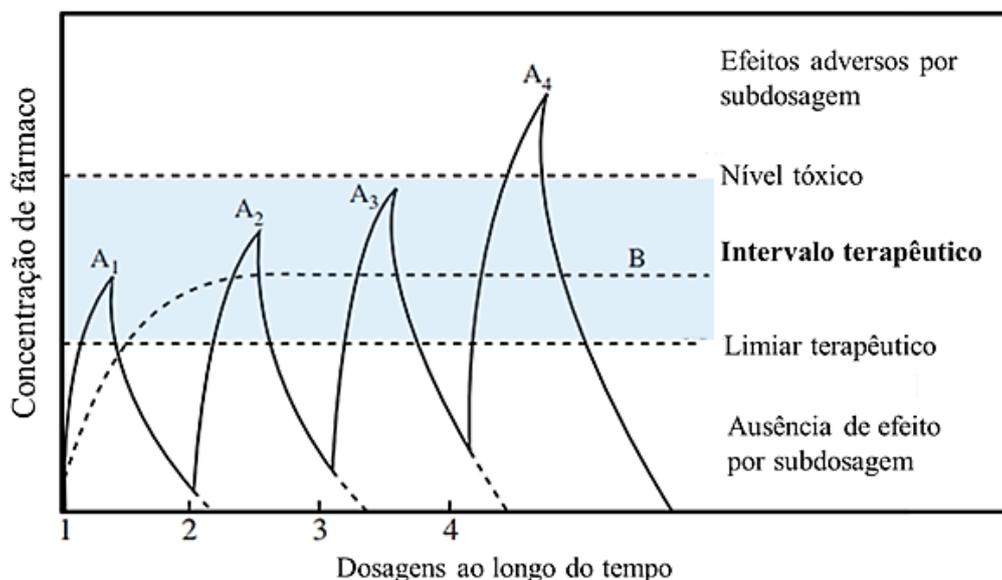


Figura 8 - Perfil dos níveis de concentração de fármaco na circulação sistêmica com administrações de sucessivas doses (A₁, A₂, ...) em comparação com um perfil ideal de concentração (B). Adaptado de: (Martins, 2012)¹⁰³.

Devido ao grande papel que os fármacos têm no controlo da função celular no processo de regeneração dos tecidos e, dado que as formas farmacêuticas convencionais apresentam uma eficácia reduzida, sendo necessário a administração regular de várias doses para se

obter o efeito terapêutico pretendido, é essencial encontrar um modo de entrega adequado para disponibilizar o fármaco nos tecidos desejados no momento certo e na concentração requerida.¹⁰⁴ Um dos exemplos mais relevantes é no tratamento do cancro, pois a maioria dos fármacos que são utilizados afetam as células saudáveis, tornando-se assim indispensável a pesquisa de novos fármacos, mas principalmente novas formas de transporte do fármaco sem danificar as células saudáveis e de forma a eliminar os tumores.¹⁰⁵

O desenvolvimento de novos métodos para libertação controlada de fármacos deve ter em conta diversos fatores, tais como, a toxicidade, biocompatibilidade, degradabilidade e controlo da libertação dos fármacos. Desta maneira, obtém-se uma administração mais segura e eficiente e, conseqüentemente, uma diminuição dos efeitos secundários.¹⁰⁵ Várias são as vantagens dos sistemas de libertação controlada, sendo algumas delas as seguintes¹⁰⁶:

- Diminuição da toxicidade e maior tempo do fármaco na circulação sanguínea;
- Diminuição dos efeitos secundários devido à maior precisão e eficiência com que se administra o fármaco no organismo;
- Libertação progressiva e controlada, a partir da degradação do material de transporte;
- Administração mais segura com ausência de reações inflamatórias locais e um menor número de doses;
- Tanto substâncias hidrofílicas como lipofílicas podem ser incorporadas.

Em engenharia de tecidos, os *scaffolds* são também usados para servirem como um suporte para libertação de fármacos. A libertação controlada de fármacos num *scaffold* pode acelerar o processo regenerativo dos tecidos localmente e contornar as preocupações com os potenciais efeitos sistémicos indesejáveis de um medicamento no organismo. A incorporação do fármaco no *scaffold* (para posterior libertação) pode ser feita por adsorção deste à superfície do material, incorporando-o diretamente ou sob a forma encapsulada no material. A subsequente libertação do fármaco ocorre por difusão ou devido à degradação do *scaffold* e/ou do material usado no encapsulamento do fármaco. A quantidade e a duração da libertação do fármaco podem ser controladas alterando a composição do

material, as suas características estruturais ou o método usado de integração do fármaco no *scaffold*.⁹

Neste trabalho, a levofloxacina é o fármaco de estudo para ser incorporado nos *scaffolds*. A levofloxacina, em pó, foi incorporada diretamente na composição da pasta, na sua forma livre e na forma encapsulada.

1.5.1. Levofloxacina

A levofloxacina é um antibiótico da família das fluoroquinolonas de terceira geração que inibe as enzimas bacterianas ADN girase e topoisomerase IV, atuando assim no processo de divisão celular das bactérias. Este fármaco, apresenta a capacidade de inibir a maioria dos organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Relativamente à sua estrutura, vários estudos demonstram que o átomo flúor ajuda na atividade contra os patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (Figura 9).^{47,107}

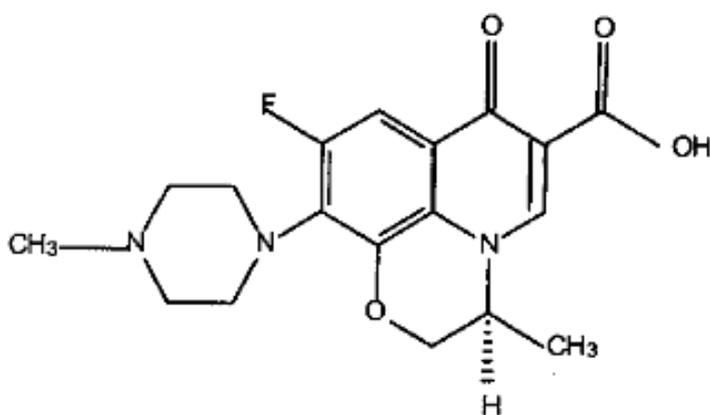


Figura 9 - Estrutura química da levofloxacina. Retirado de: (Pinos *et al.*, 2000)¹⁰⁷.

A levofloxacina é um antibiótico de amplo espectro com excelente penetração tecidual e disponibilidade em formulações orais e intravenosas, geralmente bem toleradas. A sua semi-vida após doses únicas (500 mg) ou múltiplas doses variou de 6,4 a 7,4 h e 6,9 a 7,6 h, respetivamente. Este fármaco está disponível na forma de pó, com uma temperatura de fusão igual a 200°C. A levofloxacina é solúvel quer em solventes orgânicos quer em água, dependendo do valor do pH. Em soluções aquosas e com um pH ácido torna-se mais solúvel e estável. Esta característica é importante, considerando que o valor do pH do

corpo humano é normalmente igual a 7,4, podendo variar de 3 a 9 devido a varias causas, tais como, acidentes, desequilíbrio no sistema biológico devido a doenças, infeções, entre outros fatores. A levofloxacin é usada com grande potencial no tratamento de diversas infeções do trato intestinal, pele, trato urinário, bem como na osteomielite e outras doenças infecciosas dos ossos e articulações.^{108,109}

1.6. Técnicas para fabrico de *scaffolds*

A habilidade de controlar a arquitetura de um *scaffold*, a composição do material e a porosidade, através do design e fabrico, pode ser um fator crítico no sucesso clínico da engenharia de tecidos. Atualmente existe uma variedade de técnicas de fabrico de *scaffolds*, podendo estas dividirem-se em técnicas convencionais e técnicas avançadas denominadas também de manufatura aditiva. As denominadas convencionais apresentam algumas desvantagens, tais como, a limitação do controlo da estrutura dos poros e uma baixa reprodutibilidade. Por este motivo, o interesse no fabrico de estruturas porosas tridimensionais (3D) com maior controlo, tem aumentado significativamente, podendo estas ser obtidas através de manufatura aditiva, considerada a melhor alternativa para alcançar um controlo preciso do tamanho de poro, geometria e interconectividade.^{21,110} De seguida serão apresentados alguns dos processos convencionais e de manufatura aditiva usados na produção de *scaffolds* cerâmicos.

1.6.1. Técnicas convencionais

1) *Salt sintering*

Consiste numa mistura de cristais de sais solúveis, como por exemplo o cloreto de sódio (NaCl), com o cerâmico. De seguida, procede-se à conformação por prensagem. Após a conformação, o material é submetido a um processo de sinterização a uma alta temperatura sem ultrapassar a temperatura de fusão do sal, conferindo-se assim uma maior resistência. Posteriormente, o material compactado é colocado em água onde é feita a lixiviação das partículas de sal (Figura 10). Desta forma, obtém-se um conjunto específico de diâmetro de poros, embora a aglomeração de partículas de sal possa alterar o tamanho dos poros e a sua distribuição durante a lixiviação.^{42,111} Apesar de ser uma técnica simples, a temperatura de

fusão do sal é aproximadamente 800°C, o que pode ser uma temperatura relativamente baixa comparativamente à temperatura de sinterização dos fosfatos de cálcio que são geralmente superiores (1000 - 1250 °C).⁴²

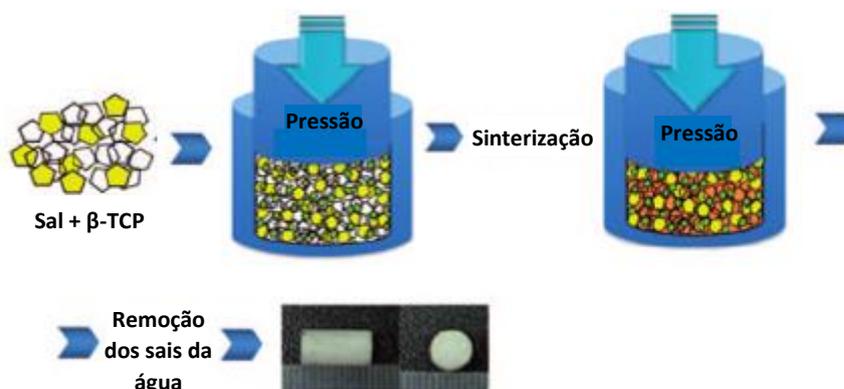


Figura 10 - Técnica *Salt sintering*. Adaptado de: (Junge et al., 2011) ¹¹².

2) Replicação de Esponja polimérica

Neste método, uma esponja polimérica altamente porosa é imersa numa suspensão cerâmica até os seus poros ficarem completamente preenchidos, permitindo a formação de uma dispersão uniforme de pó cerâmico dentro do modelo. De seguida, a esponja é seca numa estufa. Após a secagem, é colocada num forno onde se irá degradar termicamente a temperaturas controladas, de modo a manter a estrutura porosa. Por fim, é sinterizado o *scaffold* a temperaturas elevadas, para aumentar as propriedades mecânicas (Figura 11).¹¹³ Este método permite controlar o tamanho de poro, através da seleção prévia da esponja e obter *scaffolds* com diferentes formas.



Figura 11 - Técnica esponja polimérica. Adaptado de: (Freitas, 2013) ⁴².

3) Espumas cerâmicas

Esta técnica permite produzir estruturas porosas recorrendo a espumas cerâmicas. As espumas são obtidas através da adição de aditivos (como por exemplo sais de carbonato ou peróxido de hidrogénio) a uma suspensão, em constante agitação. A adição deste tipo de aditivos provoca a formação de bolhas de gases no interior da suspensão, originando a espuma. De seguida, a espuma é submetida a sucessivas etapas de secagem e tratamentos térmicos (Figura 12). A maior desvantagem deste método é que pode produzir uma estrutura com poros praticamente não conectados e uma superfície externa não porosa.^{114,115}

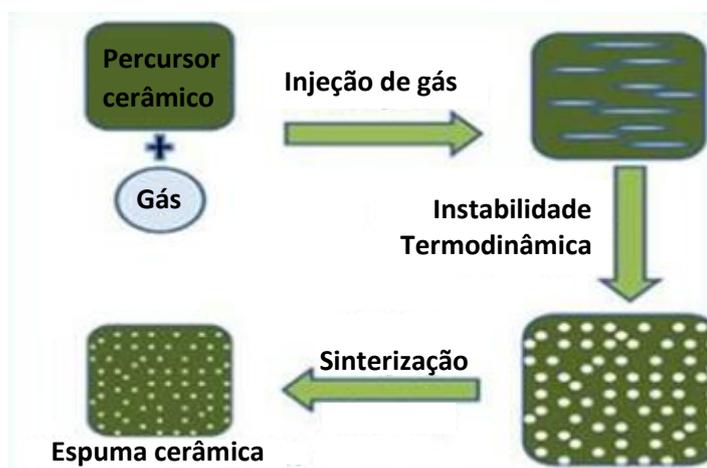


Figura 12 - Técnica espuma cerâmica. Retirado de: (Patel *et al.*,2015)¹¹⁵.

1.6.2. Manufatura aditiva

A manufatura aditiva ou fabrico rápido aditivo permite construir objetos camada sobre camada, a partir de um modelo digital tridimensional, obtido a partir do desenho computadorizado (CAD). Várias são as vantagens da manufatura aditiva, como a redução de etapas e processos na produção de um objeto, a possibilidade de combinação de várias geometrias, ausência de desperdício de material, controlar a arquitetura (tamanho, forma, porosidade, orientação) e propriedades mecânicas. Apesar de todas estas vantagens, esta técnica tem a vantagem adicional de produzir peças customizadas, partindo de um modelo CAD com a forma do tecido desejado, retirado da informação da tomografia

computorizada (TC) ou imagiologia de ressonância magnética. Esta técnica permite também o fabrico de estruturas com combinações de diferentes materiais, criando gradientes microestruturais e químicos.^{116,117}

Atualmente, são várias as tecnologias de manufatura aditiva classificadas em quatro categorias de acordo com o tipo de matéria prima utilizada: líquido, filamento/pasta, pó e placa sólida.¹¹⁸ Neste trabalho, a tecnologia de interesse é o robocasting, que tem como princípio a produção de peças por extrusão de uma pasta cerâmica.¹¹⁷

➤ **Robocasting**

Uma das técnicas que tem vindo a despertar muito interesse nos últimos anos é o robocasting, que se baseia na deposição de uma pasta viscosa concentrada para formar estruturas tridimensionais. Esta deposição é realizada através de uma seringa com uma ponta cónica, de diâmetro igual à espessura pretendida para cada filamento, sendo a distância entre os filamentos depositados controlada por CAD (Figura 13). Esta técnica apresenta grandes vantagens, pois permite obter com precisão estruturas 3D, com diferentes formas e complexidades, e não requer a utilização de nenhum molde ou de um material de suporte, salvo no caso de geometrias muito complexas.^{21,119}

Inicialmente, começa-se por preparar a pasta e, posteriormente, é colocada numa seringa sob condições de vácuo, para que sejam eliminadas as bolhas de ar que possam estar presentes e que iriam causar posteriores defeitos no material. De seguida, a seringa, é colocada no dispositivo de deposição robótica que irá ser controlado por computador e proceder à deposição, de acordo com o modelo CAD preparado. A deposição da pasta é depositada através da ponta cónica, como mencionado anteriormente, a uma velocidade constante imposta e com um movimento ao longo do eixo x e y.^{42,120}

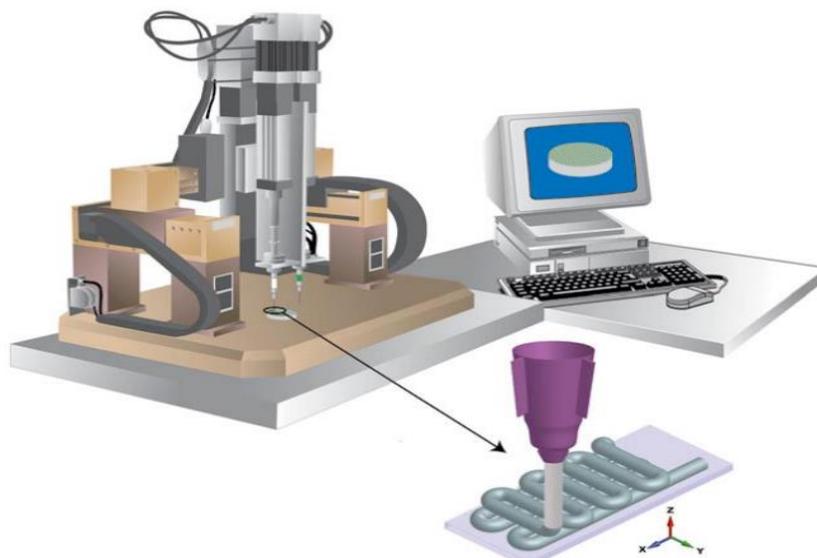


Figura 13- Equipamento de robocasting. Retirado de: (Munch *et al.*, 2008) ¹²¹.

Um dos grandes desafios para este método é a otimização e controlo das propriedades reológicas das pastas, sendo assim necessário uma cuidadosa caracterização reológica. Uma das propriedades a ter em conta é a viscoelasticidade das pastas. A pasta deve fluir durante o processo de extrusão e reter a forma imediatamente após a sua deposição.¹²¹ Por norma, para a obtenção de pastas à base de CaPs, com estas características é necessário usar diferentes componentes, como, aglutinantes, dispersantes, floculantes, etc., e uma concentração elevada de pós (para aumentar a resistência). Após a impressão, todos os *scaffolds* à base de CaPs são submetidos a uma etapa de sinterização a altas temperaturas para obter propriedades mecânicas adequadas.^{119,122–126} O facto dos *scaffolds* serem submetidos a um processo de sinterização de altas temperaturas, dificulta a incorporação do fármaco nas pastas antes da sinterização, podendo ser adicionado apenas após a sinterização por imersão dos *scaffolds* em suspensões com concentrações elevadas de fármaco.^{6,12} Desta maneira, a quantidade de fármaco que é impregnada depende da capacidade de absorção do *scaffold*, bem como das suas propriedades superficiais. Para superar essas dificuldades, o fabrico de *scaffolds* sem sinterização, e conseqüentemente, sem a necessidade de adição de vários aditivos, pode ser uma alternativa.

Martínez-Vázquez *et al.*¹²⁷ sintetizaram *scaffolds* compósitos de HA dopada com Si + gelatina, carregados com fármaco e livres de sinterização. O comportamento biológico e a biodegradabilidade destes compósitos foram superiores aos *scaffolds* de controlo (HA

dopada com Si). Contudo, a principal desvantagem está relacionada com a baixa concentração de sólidos e as propriedades reológicas das pastas, que não permitiram que os filamentos mantivessem a integridade da estrutura imposta durante o processo de impressão. O poder de gelificação da gelatina fornece propriedades viscoelásticas à pasta, servindo como suporte necessário para a construção de uma estrutura 3D, porém, a viscoelasticidade dos filamentos não é suficiente para suportar o peso das várias camadas que constituem o *scaffold*, provocando o colapso parcial da estrutura.

Recentemente, Marques A.C. et al.¹²⁸, mostrou a possibilidade de obter *scaffolds* compósitos de fosfatos de cálcio bifásicos numa matriz de quitosano por robocasting, para libertação controlada de levofloxacina. Os autores verificaram que a adição do fármaco alterou significativamente a reologia das pastas e, conseqüentemente, a arquitetura dos poros dos *scaffolds*. O fármaco não se apresentava homogeneamente distribuído na matriz compósita, originando aglomeração de partículas e conseqüentemente, um aumento da microporosidade. Embora os autores apresentem melhorias significativas no desenvolvimento das pastas para impressão, relativamente ao trabalho de Martínez-Vázquez et al.¹²⁷, a resistência à compressão dos *scaffolds* obtidos apresentou valores relativamente baixos. O trabalho desenvolvido na presente dissertação teve por base este estudo, com o objetivo de melhorar a performance deste tipo de compósitos na impressão por robocasting e entender/ultrapassar os problemas detetados.

Capítulo 2

Procedimento Experimental

2. Procedimento experimental

De forma a cumprir os objetivos propostos, o presente trabalho foi dividido em 4 (quatro) partes. Inicialmente, procedeu-se à síntese dos pós de CaP não dopados e dopados com $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. De seguida, foram preparadas as pastas com propriedades reológicas adequadas para impressão por robocasting, com e sem fármaco. Uma vez preparadas as pastas com as características pretendidas, foram produzidos *scaffolds* com diferentes porosidades. Na fase final, efetuaram-se ensaios de libertação de fármaco nos *scaffolds*.

2.1. Materiais

Na produção dos pós foram utilizados, como reagentes, nitrato de cálcio tetrahidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Panreac], hidrogenofosfato de diamónio [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Panreac], (Sigma-Aldrich), como precursores de Ca e P, respetivamente, e cloreto de ferro (II) tetrahidratado [$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Honeywell) e nitrato de ferro (III) nanohidratado [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich], como precursores de Fe^{2+} e Fe^{3+} , respetivamente. Foi usado também hidróxido de amónio [NH_4OH], de forma a ajustar o valor do pH durante a síntese.

Na preparação das pastas foram utilizados os pós preparados anteriormente, quitosano (baixo peso molecular, Sigma-Aldrich), ácido acético [CH_3COOH , Honeywell], ácido cítrico [$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, Honeywell], genipina [$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5$] e nanopartículas de magnetite [fluidMAG-Chitosan, Chemicall, Alemanha]. O fármaco testado foi a levofloxacina em pó [$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{FO}_4$, Sigma-Aldrich] e encapsulada em microcápsulas de gelatina.

2.2. Métodos de preparação

2.2.1. Síntese de pós de CaP puros e dopados com ferro

Neste trabalho, foram sintetizados pós de β -TCP, β -TCP dopados com Fe^{2+} , pós de HA e HA dopados com Fe^{3+} . Os diferentes pós foram obtidos pelo método de precipitação química em meio aquoso, num reator a 30°C em agitação constante, seguindo-se a filtração sob vácuo e posteriormente secagem numa estufa a 100°C. Por fim, os pós foram

submetidos a uma pré-moagem de 1 minuto, calcinados a 1100°C e moídos a seco num moinho de bolas. A Figura 14 apresenta um esquema do processo de obtenção dos pós.

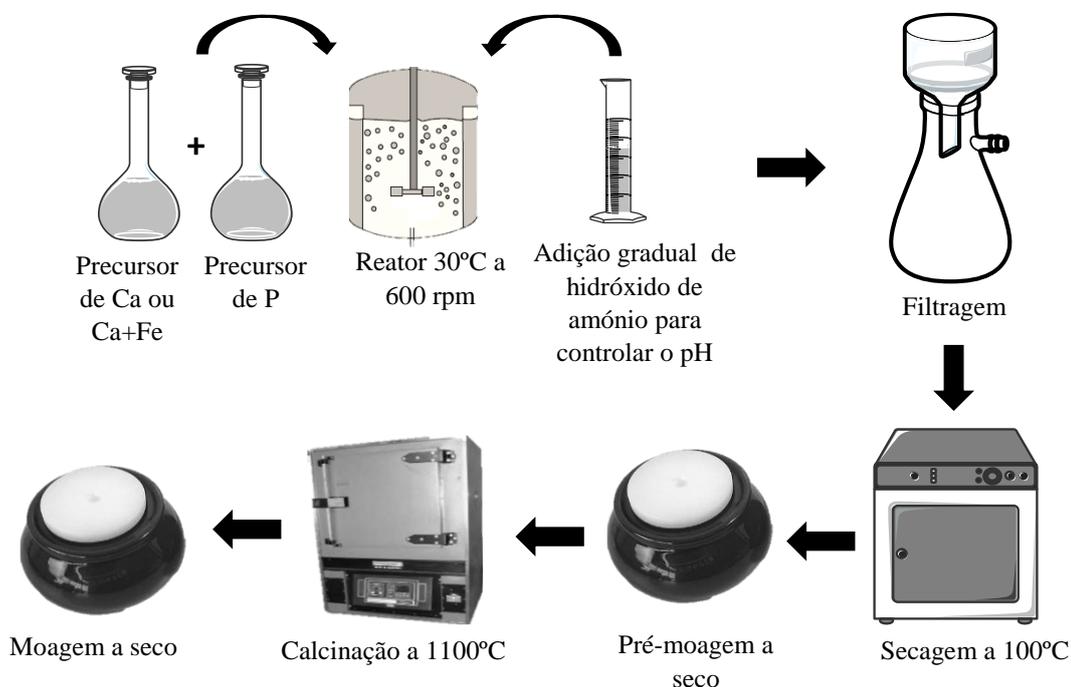


Figura 14 - Esquema do processo da síntese dos pós.

A preparação do pó β -TCP, designado por TCP, foi baseada no procedimento experimental descrito por Singh et al.¹²⁹ e Destainville et al.¹³⁰ com pequenas modificações. Inicialmente prepararam-se as soluções aquosas dos precursores de cálcio (Ca) e de fósforo (P) com água desionizada, de forma a obter uma razão molar de Ca/P=1,51 para se evitar o aparecimento de pirofosfato de cálcio (CPP).¹³⁰ Depois de preparadas as soluções, estas foram colocadas num reator a 30°C com uma agitação constante de 700 rpm, durante 3 horas. De modo a manter o pH no valor pretendido ($\text{pH} \cong 8$), este foi medido e registado de 5 em 5 minutos com um medidor de pH (Consort C1010) durante as 3 h de síntese, de modo a adicionar-se, sempre que necessário, hidróxido de amónio. Após as 3 h de reação, o pó precipitado foi filtrado sobre vácuo e posteriormente seco a 100°C durante 24 h. O pó seco sofreu uma pré-moagem num moinho de bolas planetário, numa razão de 1:3 em peso de pó e bolas, durante 1 minuto, com o objetivo de quebrar os aglomerados formados durante a secagem. Posteriormente o pó foi calcinado a 1100 °C, a uma taxa de 5°C/min, com um patamar de 5h a 1100°C, seguindo-se um arrefecimento natural até à temperatura

ambiente. De seguida, os pós foram moídos num moinho de bolas (razão pó:bolas de 1:3) de modo a obter-se um tamanho de partícula desejado, sendo por fim passados numa rede de 40 μm .

A síntese do pó β -TCP dopado com 6 mol% de Fe^{2+} , designado por FeTCP, foi baseada no trabalho de Singh et al.¹²⁹ e Tampieri et al.¹⁷. Foram preparadas duas soluções com os precursores Ca + Fe e P de forma a obter uma razão molar $(\text{Ca}+\text{Fe})/\text{P}=1,53$, para evitar a formação de CPP como fase secundária. As soluções preparadas foram posteriormente colocadas num reator a 30°C com uma agitação constante de 600 rpm, durante 3 horas. O valor do pH pretendido foi de 6,5, havendo sempre a necessidade de se controlar o pH durante todo o tempo de síntese com o intuito de se evitar a formação de óxidos de ferro.¹³¹ Após as 3 h de síntese, o processo de filtração, secagem e pré-moagem foi idêntico ao anterior, tal como o tratamento térmico e a moagem final.

A produção do pó de HA e do pó de HA dopada com Fe^{3+} , designada por FeHA, foi baseada no trabalho de Gomes et al.⁶⁹. Para tal, prepararam-se soluções com os precursores de Ca e P como anteriormente, usando uma razão de $\text{Ca}/\text{P}=1,73$, a 30°C durante 3 h com agitação constante de 600 rpm, e valores de pH superiores a 10. O pH da síntese foi mantido a valores superiores a 10, com a adição de NH_4OH sempre que necessário, para evitar a formação de β -TCP. Após a síntese, os pós foram submetidos às mesmas condições de moagem e calcinação que os pós anteriormente mencionados

2.2.2. Preparação das pastas com e sem fármaco

Neste trabalho foram preparadas dois tipos de pastas para impressão no robocasting: pastas de HA/ β -TCP, designadas por HATCP, e pastas de FeHA/Fe- β -TCP, designadas de FeHATCP através da mistura dos pós de HA+TCP e FeHA+FeTCP, respetivamente, com uma solução aquosa de quitosano (CH). Inicialmente, começou por se preparar uma solução de 3 wt.% CH dissolvendo o CH numa solução de 0,5 wt.% de ácido acético (AA) à temperatura ambiente. De seguida, com esta solução de quitosano, tentaram-se obter suspensões aquosas de HATCP e FeHATCP, com concentrações de sólidos acima de 40 vol.%. No entanto, à medida que se adicionavam os pós à solução de CH, observou-se a formação de pequenos “grumos”, que resultavam do aumento do pH da suspensão ($\text{pH}\approx 10$). Nestes valores de pH o CH deixa de ser solúvel, originando esses grumos na

pasta.⁸⁰ Tais efeitos limitaram o aumento da concentração de sólidos na pasta e impossibilitaram o processo de extrusão no robocasting.

Devido à impossibilidade de se aumentar a concentração de ácido acético, por ser um material nocivo à saúde humana¹³², utilizou-se o ácido cítrico (AC) que é um material atóxico¹³³, de forma a manter o pH da suspensão suficientemente ácido com a adição dos pós durante a preparação da pasta, mantendo o quitosano dissolvido. Para se perceber qual a melhor concentração de ácido cítrico a utilizar, dissolveu-se 3 wt.% de CH em soluções de 2, 5 e 10 wt.% de AC. De seguida, foram preparadas suspensões de HATCP e de FeHATCP, com cada uma das soluções de quitosano, variando o volume de sólidos e as razões (relativas à massa total de sólidos) de HA/TCP e FeHA/FeTCP, com o objetivo de se obter pastas concentradas e capazes de serem extrudidas de uma forma contínua. Das várias suspensões preparadas, apenas para a solução de 3 wt.% de quitosano dissolvido em 10 wt.% de AC foi possível obter pastas com uma boa consistência e passíveis de serem usadas no robocasting.

Uma vez selecionada a concentração de ácido cítrico tentou aumentar-se a concentração de quitosano para 5 wt.%, de forma a avaliar qual a melhor composição para obter *scaffolds* com melhor desempenho mecânico. Tal como para as pastas com 3 wt.% CH + 10 wt.% AC, estas também apresentavam boa capacidade de extrusão no robocasting. A Tabela 3 apresenta um resumo das composições das pastas puras e dopadas preparadas: concentração máxima (vol.%) de sólidos e a concentração (wt.%) de cada pó (em relação à massa total de sólidos), utilizando-se a solução de 3 wt.% e 5 wt.% de quitosano.

Tabela 3 – Concentração máxima (vol.%) de sólidos e concentração (wt.%) de cada pó (em relação à massa de sólidos) que se conseguiu obter nas pastas aquando preparadas com uma solução de 3 wt.% e 5 wt.% CH dissolvidas em 10 wt.% de AC.

<u>Pastas</u>	Vol% sólidos	Compostos (wt.%)				
		HA	TCP	FeHA	FeTCP	
3 wt.% CH	HATCP	42	64	36	-	-
	FeHATCP	39	-	-	64	36
5 wt.% CH	HATCP	34	76	24	-	-
	FeHATCP	40	-	-	70	30

Após um ensaio preliminar da resistência à compressão dos *scaffolds* obtidos com as pastas apresentadas na Tabela 3, confirmou-se que o compósito contendo 5 wt.% de CH deu origem a melhores propriedades. Por este motivo, em todas as pastas feitas ao longo deste trabalho foi usada a solução de 5 wt.% de quitosano dissolvido em 10 wt.% de AC.

Uma vez que também se pretende usar os *scaffolds* como suportes para liberação de fármaco, foram preparadas pastas FeHATCP incorporando 0,1 wt.% e 2,5 wt.% de levofloxacina em pó, e 0,1 wt.% de levofloxacina em cápsulas de gelatina (Figura 15).

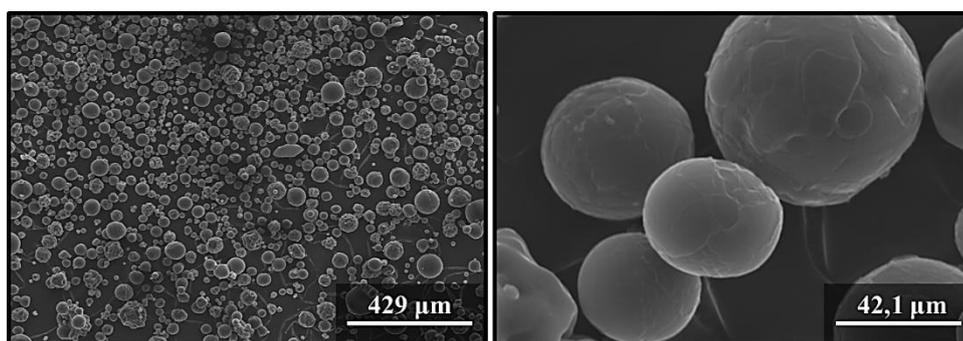


Figura 15 – Imagens de SEM de cápsulas de gelatina incorporadas com levofloxacina.

Para uma melhor identificação, as pastas finais de FeHATCP com levofloxacina foram nomeadas de: FeHATCP-2,5L, FeHATCP-0,1L e FeHATCP-0,1LC, para as pastas preparadas com 2,5 wt.% de levofloxacina, com 0,1 wt.% de levofloxacina e com 0,1 wt.% de levofloxacina encapsulada, respetivamente, cujas composições se apresentam na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição das pastas de FeHATCP na presença de levofloxacina encapsulada e não encapsulada.

<u>Pastas</u>	Vol.% sólidos	Compostos (wt.%)		
		Levofloxacina	FeHA	FeTCP
FeHATCP-2,5L	40	2,5	70	30
FeHATCP-0,1L	40	0,1	70	30
FeHATCP-0,1LC	40	0,1	70	30

No final da preparação das pastas e, antes da impressão no robocasting, adicionou-se 0,5 wt.% de uma solução de genipina (em relação à massa de CH), como agente de reticulação do quitosano.⁸¹ A quantidade de solução da genipina a adicionar às pastas foi medida através de uma micropipeta e posteriormente misturada nas pastas através de uma misturadora.

2.2.3. Preparação dos *scaffolds*

Os *scaffolds* foram produzidos utilizando as pastas anteriormente preparadas, a partir de uma técnica de fabrico aditivo utilizando o equipamento robocasting da 3D Inks, LLC (Figura 16).

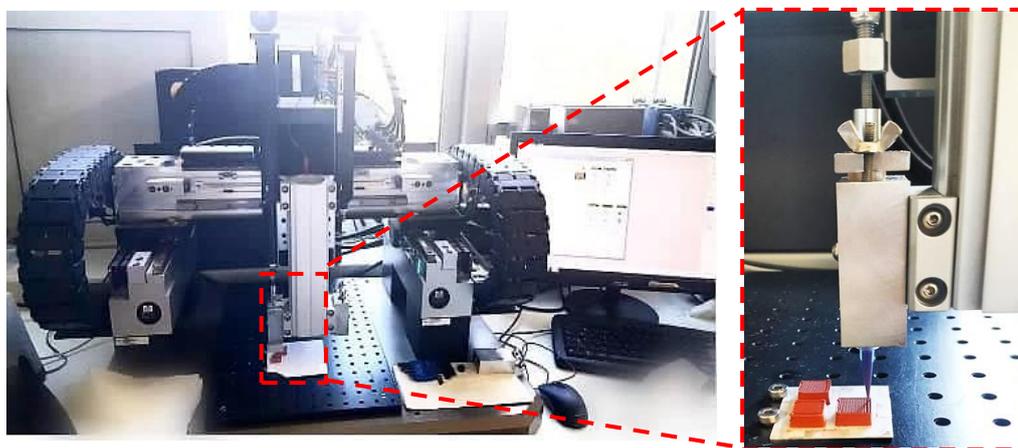


Figura 16 - Equipamento robocasting para impressão de *scaffolds*.

Inicialmente foram desenhados três modelos a partir do *software* RoboCAD, com um tamanho de poro de 300 μm , 500 μm e gradiente (com um tamanho de poro na direção do eixo do z de 300-500-300 μm) (Figura 17). Todos os modelos apresentavam um tamanho de aproximadamente 10-10-6 mm (largura-comprimento-altura, respetivamente). Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros de impressão usados para os 3 modelos de *scaffolds*.

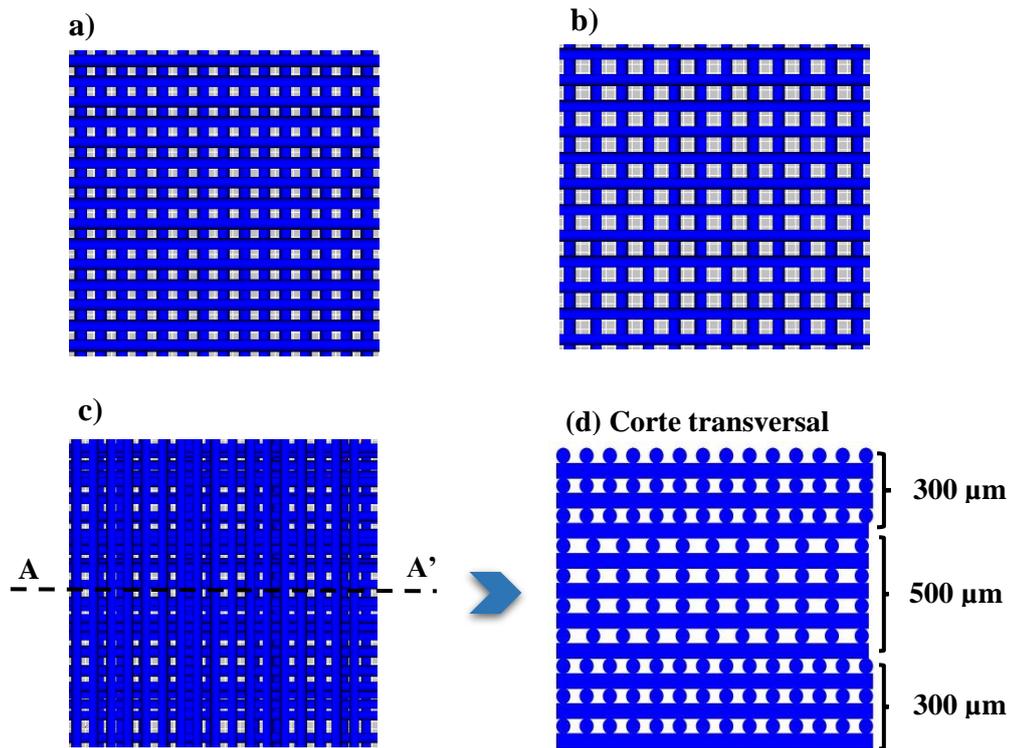


Figura 17 - Modelos dos *scaffolds*, visto do topo, com um tamanho de poro: a) 300 μm , b) 500 μm e c) Gradiente. (d) secção transversal AA' do modelo do *scaffold* gradiente apresentado em c.

Tabela 5 - Características dos modelos desenhados para cada *scaffold*.

Tamanho de poro (μm)	Diâmetro do filamento (μm)	Distância entre filamentos (μm)	Velocidade de deposição (mm/s)
300	410	710	10
500	410	910	10
Gradiente	410	710-910-710	10

As pastas anteriormente preparadas foram colocadas numa seringa de 3 mL, fixando-se a esta uma ponta cónica de diâmetro 410 μm de forma a serem extrudidos filamentos com esse diâmetro. A deposição dos filamentos foi feita sobre uma base de alumina à temperatura ambiente, como mostrado na ampliação da Figura 16, e posteriormente colocados numa estufa com humidade e temperatura controlada (37°C, com uma humidade fixa de 80%) durante 24 h. Depois das 24 h os *scaffolds* foram colocados numa estufa a 40°C até ficarem completamente secos (\cong 24 h), garantindo-se assim uma secagem homogénea.

2.3. Técnicas de caracterização

2.3.1. Caracterização dos pós

Os pós de fosfatos de cálcio obtidos foram caracterizados por diferentes técnicas. As fases cristalinas presentes nos pós calcinados foram identificadas por difração de raios-X (DRX). As amostras para este tipo de análise foram finamente moídas num almofariz de ágata, retirando-se uma amostra representativa do material. As amostras foram analisadas num difratômetro de alta resolução Bruker D8 Advance DaVinci, com uma radiação Cu K α ($\lambda=1,5405$ Å), filtrada por um monocromador de níquel (Ni), para reduzir a fluorescência proveniente do ferro, num intervalo de varrimento de $4^\circ < 2\theta < 70^\circ$ e uma largura de passo de $0,013^\circ 2\theta$ s $^{-1}$. A identificação de cada fase cristalina foi feita através da comparação entre o difratograma obtido e os difratogramas padrões, cujos valores da posição e as respectivas intensidades se encontram identificadas e tabeladas. A análise quantitativa das fases cristalinas e os parâmetros de rede dos pós foi realizada através de análises de DRX por refinamento de Rietveld (software TOPAS, versão 4.2, Bruker AXS, Karlsruhe, Alemanha).

Para a identificação dos grupos funcionais que estão presentes nos pós, recorreu-se à técnica de espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectrometry*, FTIR). Esta técnica tem como princípio base as frequências de vibração entre as ligações químicas dos átomos que constituem o material, ocorrendo estas na região do infravermelho do espectro eletromagnético.¹³⁴ O equipamento utilizado para esta análise foi um espectrofotômetro Bruker Tensor 27. Cada pó inicial foi misturado com KBr (cerca de 1,5 mg de amostra para 200 mg de KBr) e prensado a 9 tons durante 2 minutos. Os espectros de infravermelhos foram adquiridos na região entre 4000 a 350 cm $^{-1}$, com uma resolução de 4 cm $^{-1}$ e 128 varrimentos, no modo de transmitância.

A distribuição de tamanhos de partícula de cada pó foi analisada num instrumento de dispersão laser (Coulter LS230, Reino Unido) com um modelo óptico Fraunhofer, que permite a medição de partículas com tamanho entre 0,4 μ m e 2000 μ m. Para uma distribuição representativa de tamanhos, dispersou-se uma pequena porção da amostra em água, adicionando-se algumas gotas de desfloculante (Targon 1128) para melhorar a dispersão e colocou-se num banho de ultrassons durante 3 a 5 minutos. A área superficial

específica (ASE) foi determinada por adsorção de azoto num equipamento Micromeritis Gemini 2370 V5.00 (Norcross, USA), usando a isotérmica de adsorção Brunauer, Emmett e Tellerum (BET), após desgasificação do pó a 200°C-12 h, no Micromeritis Flow Prep 060 (Norcross, USA).

A morfologia dos pós foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy*, SEM), num microscópio (Hitachi S-4100, Japão) provido de um sistema de emissão de eletrões com um filamento de tungsténio. Foi utilizada uma aceleração de 25 kV e diferentes resoluções (x150, X1000, x4000, x10000, x25000). A preparação das amostras para análise foi feita a partir de suspensões em etanol, colocando uma gota de cada suspensão sobre uma lamela fixa, com cola de carbono, num porta-amostras de alumínio. As amostras foram secas numa estufa a 40°C durante 24 h antes de se proceder ao revestimento com um filme de carbono, depositado no equipamento EmitechH K950, permitindo deste modo obter imagens com uma boa definição. A fim de avaliar a distribuição da composição elementar dos materiais foi realizado um mapeamento químico através do microscópio eletrónico de varrimento (SEM, Hitachi SU-70, Hitachi High-Technologies Europe, Alemanha) equipado com um espectrómetro de energia dispersiva (*Energy Dispersive Spectroscopy* - EDS, Bruker QUANTAX 400). Para a preparação das amostras foi necessário compactar 0,3 g de pó, formando pastilhas.

2.3.2. Caracterização das pastas

As pastas preparadas foram caracterizadas através do seu comportamento reológico em modo oscilatório utilizando o reómetro rotacional Kinexus Pro + (Malvern, EUA), equipado com um sistema de medida de pratos paralelos (prato-prato, 20 mm de diâmetro) e um gap de 1 mm. Para evitar a evaporação da água das amostras durante os testes, foi utilizado um sistema de medição fechado, que inclui um anel metálico com água desionizada.

O comportamento dos pós puros e dopados com e sem levofloxacina, na presença de quitosano, foi avaliado com medidas dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') ao longo do tempo (time sweep), em pastas contendo 30 vol.% e 25 vol.% de sólidos totais numa solução de 5 wt.% de CH, sem adição de genipina, a 25°C. O comportamento de

gelificação das pastas obtidas pela adição de pós puros ou dopados a uma solução de 5 wt.% de CH, na presença de genipina, foi avaliado com medidas dos módulos elástico e viscoso ao longo do tempo (time sweep), em pastas contendo 20 vol.% de sólidos totais, a 25°C e 37°C. Em todas estas medidas foi usada uma frequência de 1 Hz e valores de tensão de corte dentro da região de viscoelasticidade linear. Não foi possível utilizar concentrações de sólidos totais superiores a 30 vol.% e 20 vol.% para estas medidas sem e com genipina, respetivamente, uma vez que após a preparação da pasta o ponto de gelificação já tinha ocorrido ($G' > G''$). De modo a obter reprodutibilidade nos resultados, tentaram usar-se tempos semelhantes para as tarefas de preparação da pasta, adição de genipina e colocação da amostra no reómetro.

As pastas finais obtidas com pós puros e dopados, na presença de genipina, contendo 34 vol.% e 40 vol.% de sólidos totais, respetivamente, bem como com pós dopados na presença de 2,5 wt.% de levofloxacina foram caracterizadas com medidas do módulo elástico (G') em função da tensão de corte a 25°C, para avaliar a sua estabilidade mecânica durante a impressão.

2.3.3. Caracterização dos *scaffolds*

A morfologia e a microestrutura dos *scaffolds* foram avaliadas por SEM, (Hitachi SU-70, Hitachi High-Technologies Europe, Alemanha) com uma voltagem de 15 kV e diferentes resoluções (x40, x80, x100, x1000).

A distribuição da levofloxacina nos *scaffolds* 3D, obtidos através das pastas FeHATCP-2,5L, foi avaliado por microscopia de fluorescência com o apoio de um microscópio de largo campo de visão (Axio Imager M2, Carlz Zeiss, Alemanha) equipado com uma lâmpada HXP 200C. A análise das imagens adquiridas foi realizada no software Zeiss Zen Blue (2018).

Os *scaffolds* produzidos foram sujeitos a testes de compressão no equipamento Shimadzu modelo AG-IS, Japão (Figura 18a), para avaliar o seu módulo de Young e resistência à compressão. Para tal, colocaram-se os *scaffolds* entre as duas placas de compressão (Figura 18b), usando uma célula de carga de 5 kN e uma velocidade de aplicação de carga de 0,5 mm min⁻¹. O número de amostras para cada um dos ensaios realizados variou entre 6 e 8.

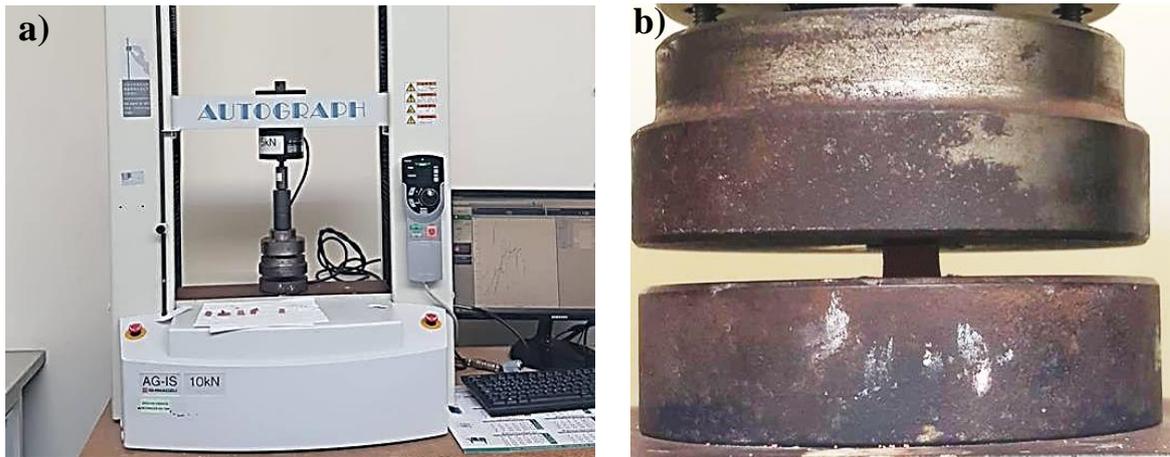


Figura 18 - a) Equipamento utilizado para realização dos ensaios mecânicos; **b)** Scaffold entre as duas placas de compressão durante o ensaio.

A tensão de compressão resultante (σ), mede a força (uniaxial) por unidade de área e calcula-se através do quociente entre a força aplicada (F) e a área da secção transversal à direção de aplicação da força (A), usando a seguinte expressão:

$$\sigma \text{ (Pa)} = \frac{F \text{ (N)}}{A \text{ (m}^2\text{)}} \quad \text{(Equação 1)}$$

A deformação do material (ε) é expressa pelo quociente entre a variação de altura da amostra (Δh) e a altura inicial da mesma (h_i), tal como indica a equação 2:

$$\varepsilon = \frac{\Delta h \text{ (mm)}}{h_i \text{ (mm)}} \quad \text{(Equação 2)}$$

O módulo de Young ou módulo de elasticidade, que indica a rigidez do material, é calculado através do quociente entre os parâmetros anteriormente mencionados:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad \text{(Equação 3)}$$

2.4. Ensaios de liberação de fármaco

Os *scaffolds* de FeHATCP carregados com levofloxacina foram testados para estudar o perfil e a velocidade de liberação do fármaco. Com as quatro composições das pastas dopadas preparadas anteriormente (sem levofloxacina, com 2,5 wt.% de levofloxacina, com 0,1 wt.% de levofloxacina e com 0,1 wt.% de levofloxacina encapsulada) foram produzidos 3 *scaffolds* para cada porosidade. No total prepararam-se 36 amostras.

Cada amostra foi pesada com precisão, colocada num tubo Falcon de 50 mL e imersa em 25 mL de um meio biomimético (ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazina etano sulfônico, HEPES buffer, VWR) a pH 7,4. Os tubos foram então colocados em banho-maria a 37°C (Memmert) e agitados horizontalmente (130 rpm) durante o ensaio (Figura 19A).

A tempos predeterminados de 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h e 72 h, para as amostras com 2,5 wt.% de levofloxacina, e 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 5 h, 6 h e 24 h, para as amostras com 0,1 wt.% de levofloxacina encapsulada e não encapsulada, foram coletados 3 mL de cada meio (Figura 19B), substituídos com o mesmo volume de HEPES e analisados por espectrometria UV/visível, a 333 nm num leitor de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech) em triplicado (Figura 19C).

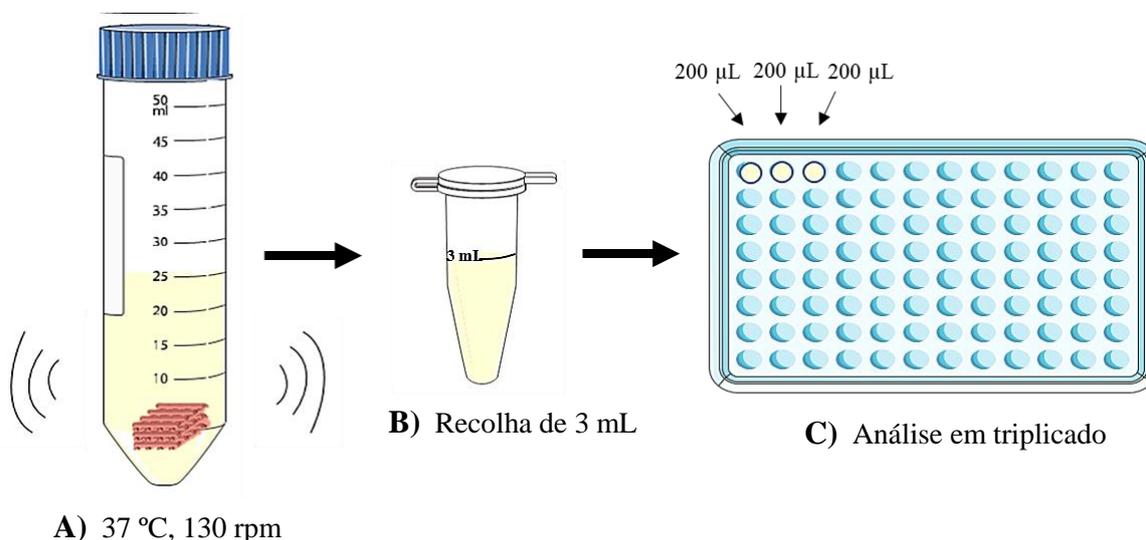


Figura 19 - Cada amostra é imersa em 25 mL de HEPES num tubo Falcon em banho-maria a 37°C e 130 rpm (A). Após um tempo predeterminado ser atingindo são coletados 3 mL de cada amostra (B). De seguida, alíquotas de 200 µL, de cada amostra de 3 mL, são transferidas em triplicado para uma microplaca de 96 poços e analisadas por espectrometria UV/visível a 333 nm (C).

As curvas de calibração foram preparadas em meio HEPES com 8 padrões (i.e. 1,32; 2,64; 5,27; 10,55; 21,09; 42,19; 84,38; 168,75 $\mu\text{g/mL}$), preparados a partir de uma solução de levofloxacin (com uma concentração igual a 1350 $\mu\text{g/mL}$, obtida pela dissolução de 13,5 mg em 10 mL de HEPES). A absorvância do HEPES também foi medida para ser usada como branco (meio sem fármaco). As curvas de calibração para quantificar a levofloxacin foram preparadas sempre antes de qualquer medida, ou seja, sempre que se atingia o tempo predeterminado.

2.5. Avaliação das propriedades magnéticas e magneto-térmicas

Com o intuito de estudar as propriedades magnéticas dos pós, por forma a obter curvas de magnetização das amostras em função do campo magnético, foram realizados ensaios num magnetómetro SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*) MPMS 3, variando o campo magnético no intervalo [-4, 4] Tesla à temperatura ambiente (300 K).

A capacidade das amostras produzirem calor (efeito hipertérmico) foi medida a partir de um equipamento de calorimetria (DM100 Series, Nanoscale biomagnetics), com a aplicação de um campo magnético alternado de 200 Gauss e uma frequência de 337 kHz.

As medidas magnéticas e magneto-térmicas foram obtidas nos pós FeHA, FeTCP e na mistura dos pós FeHATCP, bem como em pastas compósitas puras e dopadas carregadas com 1 wt.% de nanopartículas de magnetite.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização dos pós

Uma das características visíveis dos pós obtidos foi a sua coloração. Enquanto que os pós puros, HA e TCP, apresentam uma cor branca, os pós dopados, FeHA e FeTCP apresentam uma cor avermelhada e uma cor bege, respectivamente (Figura 20). A tonalidade avermelhada do FeHA é conferida pelo óxido de ferro (III) (Fe_2O_3) e está relacionada com o estado de oxidação Fe^{3+} que confere uma cor vermelha.¹³⁵ A tonalidade bege do FeTCP poderá indicar que a oxidação espontânea de Fe^{2+} para Fe^{3+} , durante o processo de obtenção do pó, foi muito reduzida, estando presente em maior quantidade o ferro no estado de oxidação (II).

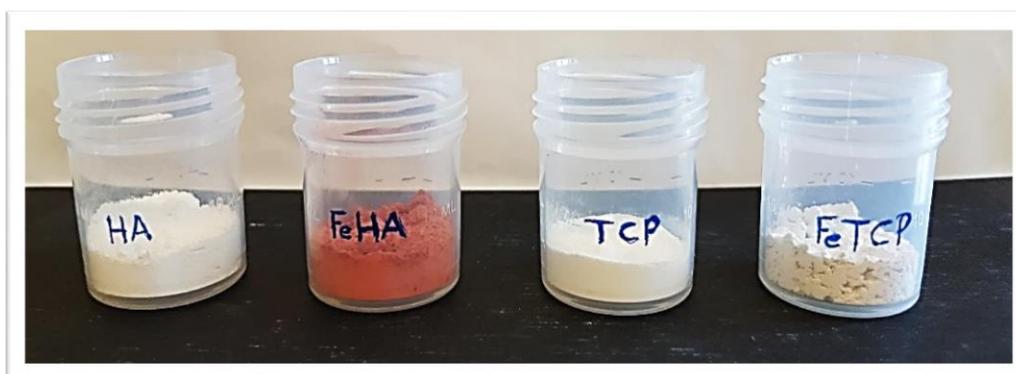


Figura 20 - Tonalidades dos pós produzidos.

As fases cristalinas presentes nos diferentes pós calcinados a 1100°C estão apresentadas nos espectros de difração de raio-X na Figura 21. A identificação das fases cristalinas foi realizada com o recurso a fichas de PDF, nomeadamente, a ficha 04-006-9376 para a identificação da fase β -TCP, a ficha 04-015-7245 para a fase HA, a ficha 01-085-0599 para a hematite (Hem, α - Fe_2O_3) e a ficha 00-045-0338 para a identificação da fase $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$.

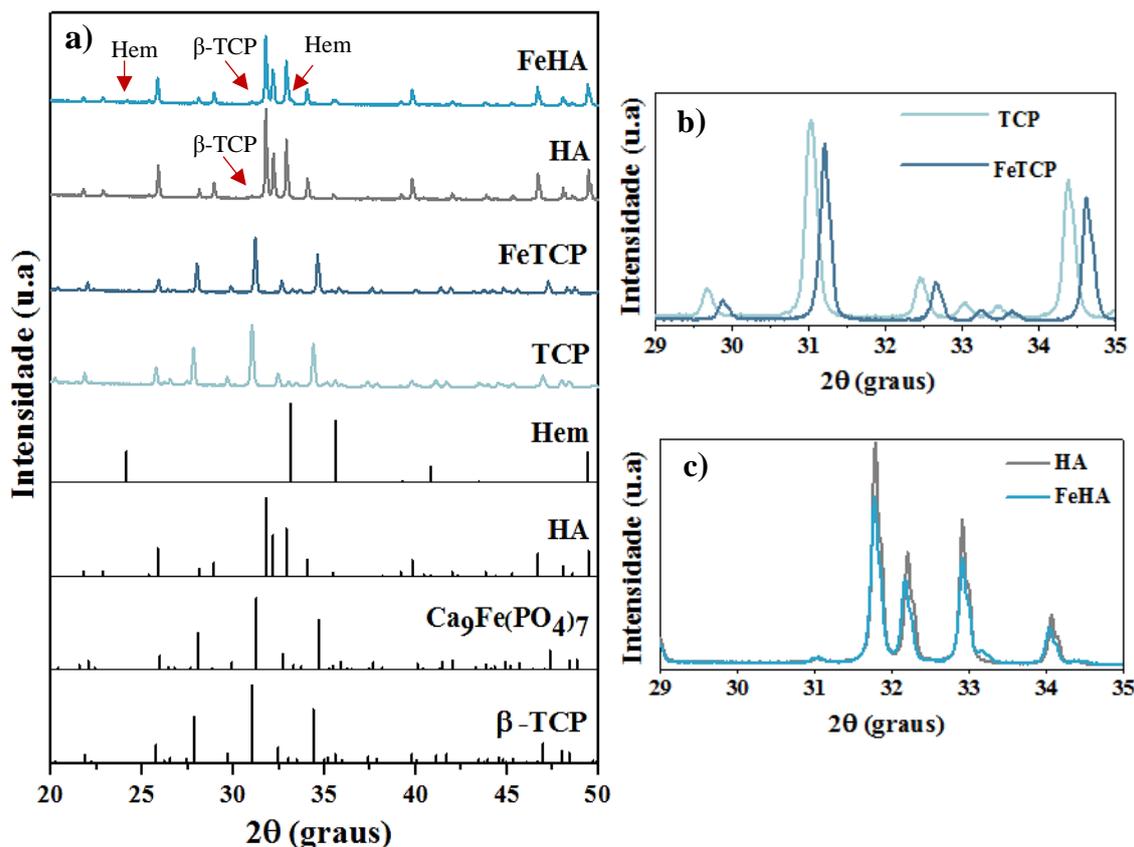


Figura 21 – (a) Espectros de DRX dos pós puros (TCP e HA) e dos pós dopados (FeTCP e FeHA) calcinados a 1100°C; (b) Ampliação da Figura 21a, em 2θ entre 29-35°, para mostrar o efeito da dopagem do β -TCP nos picos de DRX; (c) Ampliação da Figura 21a, em 2θ entre 29-35°, para mostrar o efeito da dopagem da HA nos picos de DRX.

Os resultados apresentados na Figura 21a revelam que no caso do TCP, todos os picos correspondem à fase cristalina do β -TCP, consistindo assim num β -TCP puro. Relativamente à composição dopada do β -TCP, FeTCP, a adição de Fe^{2+} na sua estrutura levou à formação da fase cristalina $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$, não havendo a formação de nenhuma fase secundária. Tanto o $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como o $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ apresentam uma célula unitária com uma estrutura trigonal do grupo espacial $R3c$.^{68,136} Para os pós de HA, além da formação da hidroxiapatite como fase principal, está presente uma fase cristalina secundária em quantidades residuais, o β -fosfato tricálcio (β -TCP). A formação de β -TCP é comprovada pelo aparecimento do pico de difração mais intenso da fase β -TCP a $2\theta=31^\circ$, assinalado com a seta a vermelho (Figura 21a). No espectro da amostra da hidroxiapatite dopada com Fe^{3+} , FeHA, verifica-se também a presença de β -TCP (seta a vermelho, Figura 21a), para além da HA como fase maioritária. Para além disso, é de notar o aparecimento de novos

picos a $2\theta=24,2^\circ$ e $2\theta=33,2^\circ$, característicos da hematite (assinalado na Figura 21a). A presença de hematite nas amostras de FeHA, mostra que parte do Fe^{3+} não entrou na estrutura cristalina da HA.

A análise quantitativa (wt.%) das fases cristalinas, obtida pelo refinamento de Rietveld dos pós estudados, resumidos na Tabela 6, corrobora com a análise qualitativa dos espectros de DRX dos pós estudados.

Tabela 6 - Análise quantitativa das fases cristalinas dos pós estudados, obtida por refinamento de Rietveld. Erro associado de $\approx 5\%$.

Amostra	wt.% da composição determinada por quantificação de Rietveld			
	β -TCP	HA	$Ca_9Fe(PO_4)_7$	Hem
TCP	100,0	-	-	-
FeTCP	-	-	100,0	-
HA	2,7	97,3	-	-
FeHA	3,9	93,5	-	2,6

A variação dos parâmetros de rede fornece indicações sobre o mecanismo de dopagem de ferro na estrutura dos pós. As mudanças nos parâmetros de rede estão relacionadas com o tamanho do raio iónico do catião ferro quando comparado com o do Ca^{2+} . A partir do refinamento de Rietveld foram obtidos os valores dos parâmetros de rede da estrutura cristalina de cada pó. A partir da Figura 22a pode-se observar que houve uma diminuição nos parâmetros $a=b$ e c na composição dopada do TCP relativamente à composição pura, o que significa que a substituição do Ca^{2+} (raio iónico= 0,1 nm) por iões com um raio iónico menor, Fe^{2+} (0,08nm), provoca pequenas diminuições nos parâmetros de rede, e consequentemente no volume da célula unitária. Este facto justifica o desvio dos picos do FeTCP relativamente ao TCP (Figura 21b), levando a deslocamentos dos picos para a direita, ou seja, para maiores valores de 2θ . Devido ao facto do raio iónico do dopante ser

menor leva também a uma diminuição na intensidade dos picos, ou seja, a cristalinidade do material diminui.^{17,137} Os resultados apresentados estão de acordo com trabalhos anteriores, onde os autores mostram que a dopagem com íons de menor raio comparado com o íon cálcio, tal como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , resulta numa contração dos parâmetros da célula unitária.^{64,66,68,138}

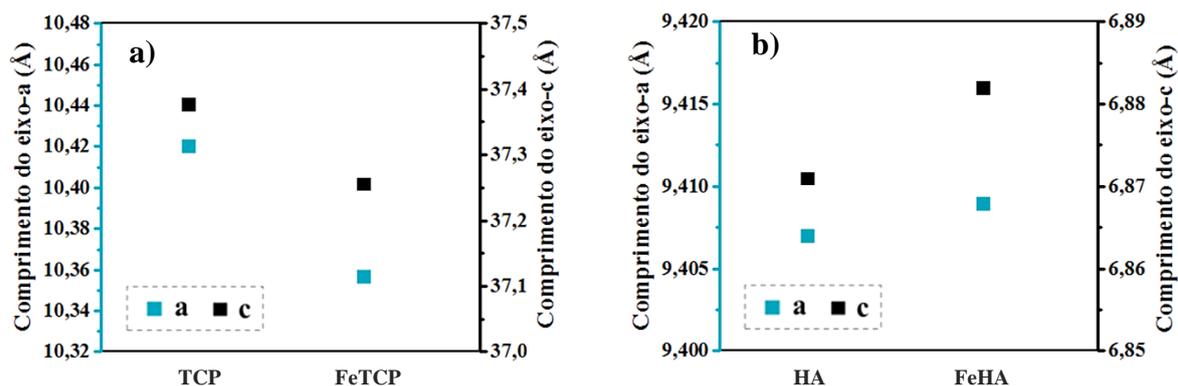


Figura 22- Influência da dopagem de nos parâmetros de rede do β -TCP (a) e da HA (b).

No caso da HA dopada com Fe^{3+} o mesmo não se verifica. Apesar de o raio iónico do Fe^{3+} (0,065 nm) ser menor que o do cálcio e que o do Fe^{2+} , os valores de $a=b$ e c da HA dopada sofreram ligeiros aumentos em relação à HA pura (Figura 22b), não perceptíveis na Figura 21c. Este resultado está de acordo com o trabalho descrito por Kaygili *et al.*¹³⁹, que mostra um pequeno aumento de ambos os parâmetros de rede (a e c) com o aumento da quantidade de ferro, com valores muito próximos dos valores padrão (HA pura). A expansão do parâmetro a , obtido no presente trabalho, pode ser devido à presença de oxi-hidroxiapatite (HA parcialmente desidratada),¹⁴⁰ o que vai de encontro ao explicado no trabalho de Gomes *et al.*⁶⁹, que menciona que no mecanismo de dopagem do Fe^{3+} na estrutura da HA o íon ferro começa por substituir primeiro três prótons H^+ e de seguida os íons cálcio, o que poderá justificar a formação da oxi-hidroxiapatite (hidroxiapatite parcialmente desidratada). No entanto, o mesmo trabalho⁷⁴ também mostrou que, quando o pó de HA dopado foi submetido a 1100°C, ocorreu uma alteração drástica nos parâmetros de rede, nomeadamente uma contração do a e uma expansão do c , justificadas pela alteração da localização do Fe^{3+} na estrutura cristalina da HA, facto não verificado no presente trabalho.

O facto de terem ocorrido apenas ligeiras alterações dos parâmetros de rede da FeHA em relação à HA significa que não existiram grandes alterações na estrutura do material, não provocando assim desvios significativos dos espectros de difração em comparação com a HA, havendo apenas uma aparente diminuição da cristalinidade (Figura 21c). As diferentes tendências nos parâmetros de rede, observadas com a dopagem de Fe na estrutura cristalina da HA em diversos trabalhos existentes na literatura, podem estar associadas ao método e condições de síntese.

De forma a identificar os grupos funcionais característicos de cada fase nos pós obtidos, são apresentados os espectros de FTIR na Figura 23a. Na Figura 23b é apresentada uma ampliação da área entre 1600-400 cm^{-1} de forma a se compreender melhor quais as regiões responsáveis por cada grupo e as diferenças entre os pós puros e dopados.

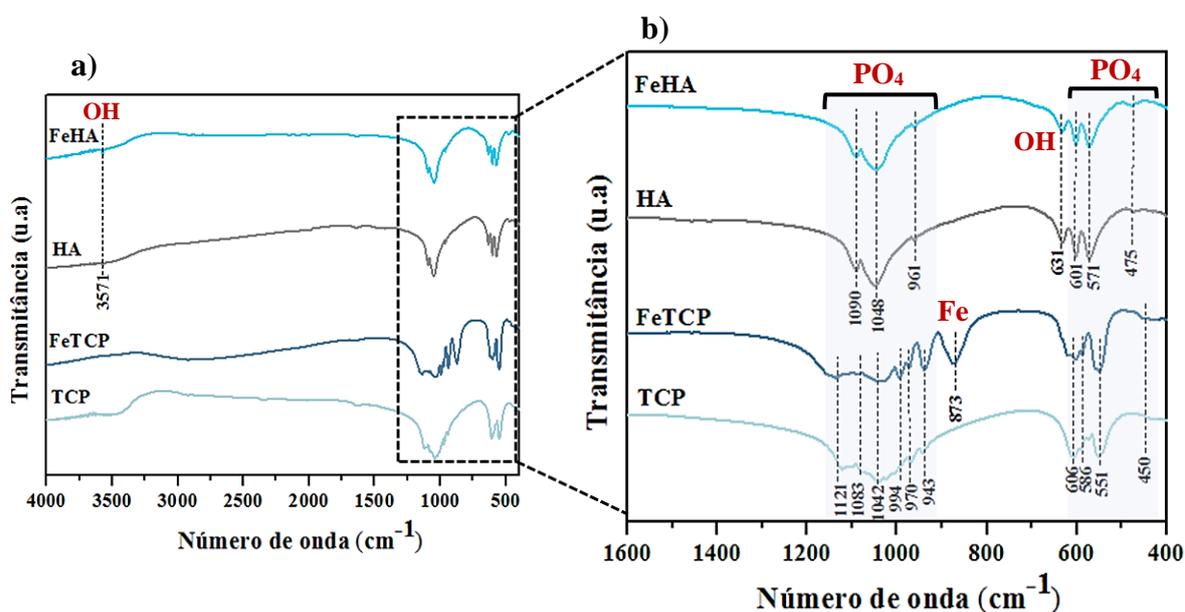


Figura 23 – (a) Espectros de FTIR dos pós puros, TCP e HA, e dopados, FeTCP e FeHA, calcinados a 1100°C; (b) Ampliação da área 1600-400 cm^{-1} para uma melhor visualização das diferenças entre os pós puros e dopados.

De acordo com a Figura 23a e 23b o espectro do TCP apresenta apenas bandas vibracionais do grupo fosfato (PO_4), que confirma a presença de β -TCP como fase cristalina única, tal como observado no DRX (Figura 21a). Os grupos fosfatos exibem normalmente diferentes modos de vibração nas regiões de infravermelho: ν_1 em 900-1000 cm^{-1} , ν_2 em 400-480 cm^{-1} , ν_3 em 1000-1200 cm^{-1} e ν_4 em 500-650 cm^{-1} .¹²⁹ No espectro do TCP os grupos

fosfatos encontram-se nessas gamas de valores, como visível na Figura 23b. O pó FeTCP apresenta modos vibracionais semelhantes aos do TCP puro, tendo como única diferença o surgimento de uma nova banda a 873 cm^{-1} característica do efeito da adição de ferro na estrutura do β -TCP (Figura 23b). Além disso, as bandas apresentadas na gama de $400\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ são características dos ortofosfatos do tipo whitlockite. Este resultado confirma a formação da fase $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ obtida no DRX, não havendo a formação de fases secundárias.^{68,136}

No espectro da HA e da FeHA podemos observar a presença de bandas características dos grupos fosfatos em $475, 571, 601, 961, 1048$ e 1090 cm^{-1} e as bandas de absorção do grupo hidroxilo (OH) em 3571 e 631 cm^{-1} , o que indica a presença da fase hidroxiapatite na composição, conforme já observado nos resultados obtidos de DRX. As fases secundárias observadas nos difratogramas de Raios-X (Figura 21a) são difíceis de detetar, devido à sua baixa percentagem ou mesmo sobreposição de bandas com a fase da hidroxiapatite. Isto justifica o facto de não ser possível detetar a hematite no espectro da FeHA na Figura 23, pois as bandas características dos óxidos de ferro encontram-se no intervalo de valores de $400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, podendo estas estarem sobrepostas com as da HA.^{76,137,141}

De acordo com trabalhos anteriores, sabe-se que para ser possível obter suspensões concentradas e minimamente estáveis, os pós deverão ter um D_{50} perto de $1\text{ }\mu\text{m}$, bem como uma distribuição de partículas adequada, em que a fração de partículas finas possa ocupar espaços intersticiais deixados pela fração de partículas mais grossas de forma a obter um bom empacotamento.¹²⁸ Na Figura 24 estão apresentadas as curvas de distribuição granulométrica (incluindo o D_{10} , D_{50} , D_{90} , $D_{\text{médio}}$ e ASE) dos pós puros e dopados após a calcinação e moagem.

A análise da distribuição dos tamanhos de partícula dos pós mostra que os pós TCP e FeTCP apresentam uma distribuição unimodal assimétrica, com tamanhos de D_{50} de $1,23$ e $1,81\text{ }\mu\text{m}$, respetivamente. Tanto a curva do TCP como a do FeTCP apresentam populações de intensidade diferente, em que a população menor de partículas finas aparece centrada em $\sim 0,4\text{ }\mu\text{m}$ e $\sim 0,2\text{ }\mu\text{m}$, respetivamente, enquanto a população mais intensa de partículas mais grossas está centrada em $\sim 2,5\text{ }\mu\text{m}$ em ambas as composições. É de salientar que para as duas composições (TCP e FeTCP) a população de partículas mais grossas apresenta

pequenos “ombros” na zona de maiores tamanhos, possivelmente devido a agregados de partículas finas e não propriamente a partículas individuais maiores.

As curvas da distribuição de tamanhos de partícula do pó da HA e da FeHA apresentam uma distribuição bimodal, com tamanho de partículas de D_{50} de $0,92 \mu\text{m}$ para a composição pura e de $0,59 \mu\text{m}$ para a composição dopada. Na curva da HA é visível uma gama de tamanhos mais alargada, relativamente à FeHA, e com populações distintas de intensidade semelhante, sendo que a população das partículas finas encontra-se centrada a $\sim 0,5 \mu\text{m}$ e a população das partículas grossas está centrada em $\sim 3,5 \mu\text{m}$. A FeHA apresenta uma distribuição de tamanhos de partícula onde a população mais intensa das partículas finas encontra-se centrada em $\sim 0,45 \mu\text{m}$ e a população das partículas grossas está centrada em $\sim 2 \mu\text{m}$.

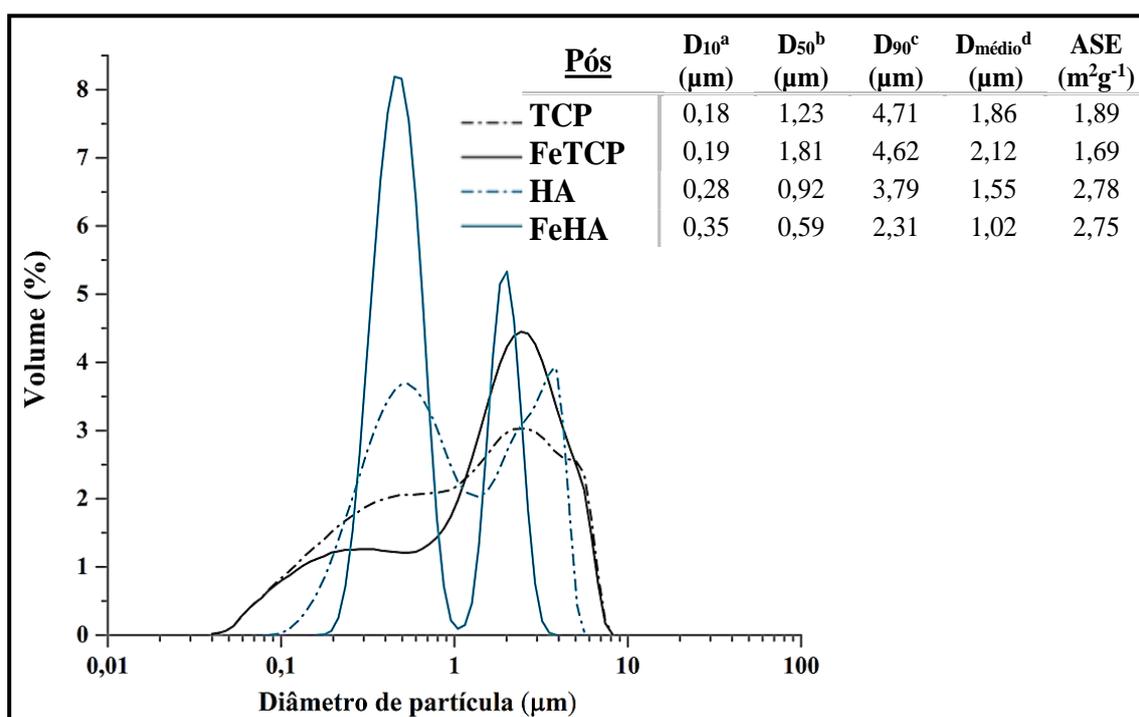


Figura 24 - Curvas de distribuição dos tamanhos de partícula dos pós, incluindo o D_{10} , D_{50} , D_{90} , $D_{\text{médio}}$ e a ASE. D_{10} - 10% do total de partículas está abaixo do valor apresentado; D_{50} - 50% do total de partículas está abaixo do valor apresentado; D_{90} - 90% do total de partículas está abaixo do valor apresentado; $D_{\text{médio}}$ - tamanho médio das partículas; ASE- área superficial específica das partículas.

A partir dos valores da área superficial específica (ASE) dos pós é possível concluir que, no geral, para um tamanho médio de partícula maior ocorre uma diminuição da ASE, ainda

que pouco significativa. Contudo, para a HA essa tendência não se verifica, pois, apesar de apresentar um $D_{\text{médio}}$ superior ao do FeHA o valor da ASE também é superior ao do FeHA. Este resultado pode ser devido ao facto do pó da HA apresentar um D_{10} de $0,28 \mu\text{m}$, que é inferior ao D_{10} da FeHA ($0,35 \mu\text{m}$), podendo levar assim a um valor de ASE superior.

De forma a analisar a morfologia das partículas dos pós estudados, estes foram observados por SEM, cujas micrografias se apresentam na Figura 25.

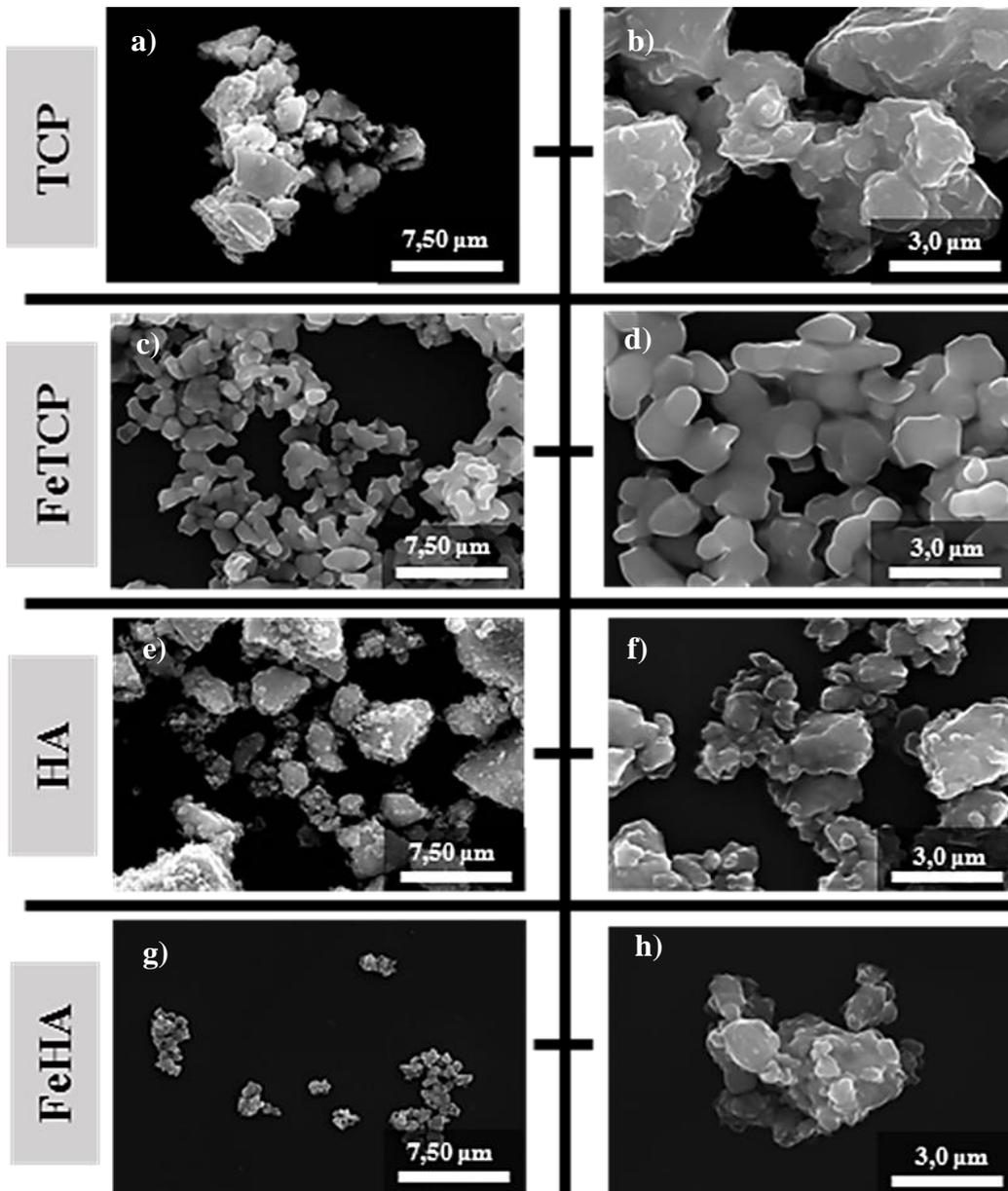


Figura 25 - Micrografias obtidas por SEM dos pós estudados: TCP (a e b), FeTCP (c e d), HA (e e f) e FeHA (g e h).

Da análise da Figura 25, é possível observar que os pós puros (TCP- a e b; e HA- e e f) apresentam uma morfologia irregular, com uma distribuição alargada de partículas. Os pós FeTCP (c e d) apresentam uma morfologia mais regular e uma distribuição de tamanhos mais uniforme, enquanto que os pós FeHA (g e h) apresentam uma morfologia mais irregular (semelhante à HA pura). Estas observações permitem concluir que a adição de ferro à estrutura do β -TCP levou a uma alteração da sua morfologia, enquanto que a adição de ferro à estrutura da HA não provocou alterações significativas na morfologia das partículas, apenas diminuição de tamanhos. A presença do ferro nos pós de TCP (FeTCP, Figura 25d) tornou as partículas mais finas, mais arredondadas e com uma superfície mais lisa, formando-se aglomerados porosos de partículas finas primárias. Este facto pode ser devido à diferença de tamanho entre os raios iónicos do Ca (0,1 nm) e do Fe (0,065-0,08 nm). No pó FeHA (Figura 25g), apesar de as partículas serem aparentemente mais finas que nos pós de HA (Figura 25e), é visível a presença de aglomerados de partículas tal como na HA, Figura 25 (f, h), o que era de esperar, pois devido ao facto do tamanho médio das partículas da FeHA ser inferior ao da HA, quando estas são sujeitas à temperatura de calcinação (1100°C) aglomeram, formando agregados de maiores dimensões.

Com o intuito de avaliar a distribuição dos elementos químicos Ca, P e Fe nos diferentes pós estudados, foi realizado em amostras de pó compacto um mapeamento por EDS, cujos resultados estão apresentados na Figura 26. Em todas as composições é possível observar uma distribuição homogénea de todos os elementos, confirmando-se a presença do ião ferro nos pós dopados.

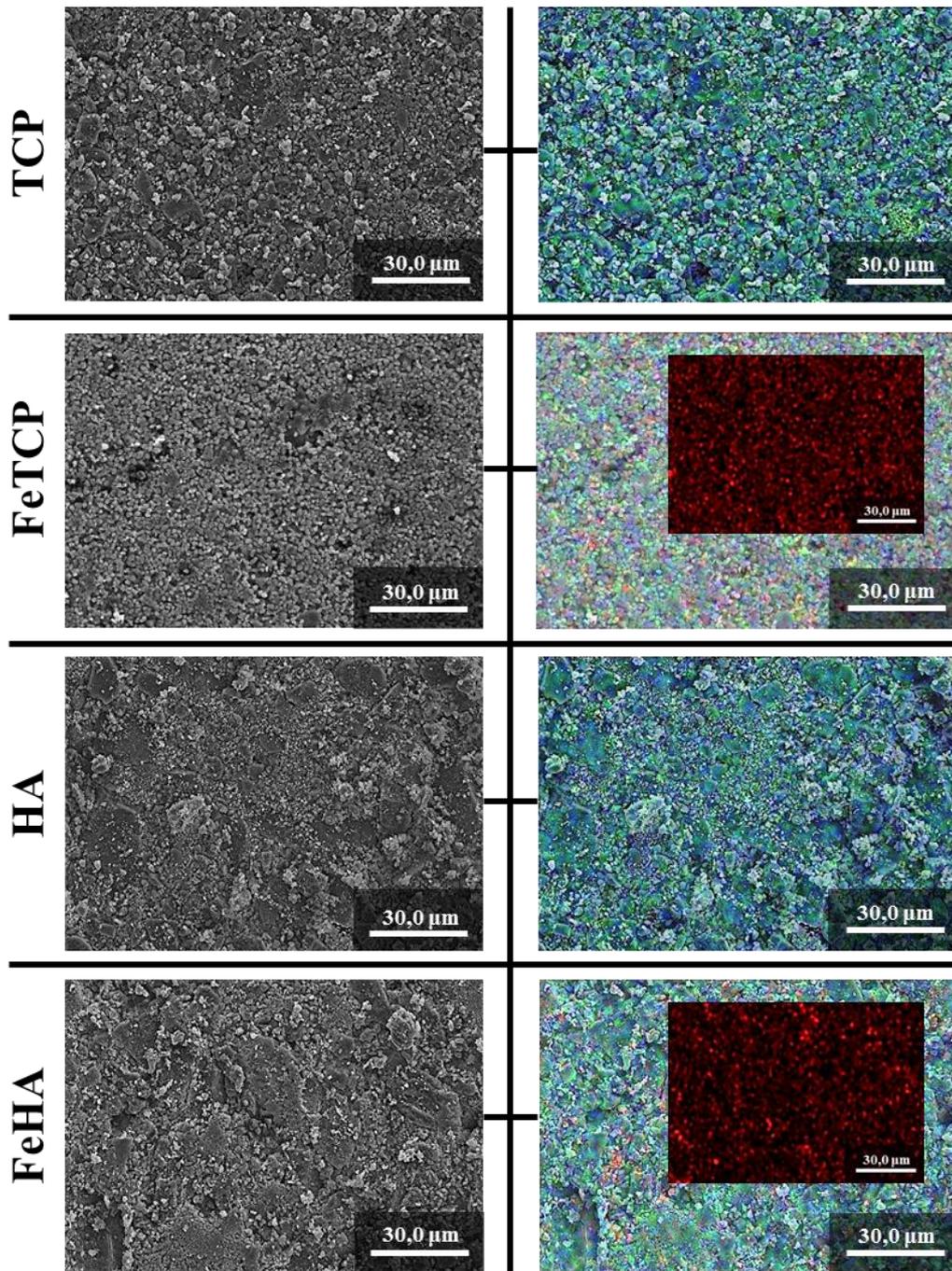


Figura 26 - Imagens de SEM e respetivo mapeamento químico obtido pelo sistema de análise EDS para as diferentes composições de pó. Os pontos azuis representam o cálcio, os pontos verdes o fósforo e os pontos vermelhos o ferro.

3.2. Caracterização das pastas

As pastas usadas para impressão de *scaffolds*, foram preparadas com misturas dos pós previamente caracterizados (secção 3.1), em diferentes proporções: 76 wt.% HA + 24 wt.% TCP para as pastas puras e, 70 wt.% FeHA + 30 wt.% FeTCP para as pastas dopadas. Uma vez que alguns pós de partida apresentaram fases cristalinas secundárias na sua composição, e partindo dos espectros de DRX, quantificaram-se por refinamento de Rietveld as fases cristalinas presentes nestas misturas. A Tabela 7 apresenta a percentagem (wt.%) de cada uma das fases cristalinas presentes em ambas as misturas.

Tabela 7 - Análise quantitativa, obtida por refinamento de Rietveld, das fases cristalinas presentes nas misturas de pós usadas para a preparação de pastas puras e dopadas. Erro associado de $\approx 5\%$.

Pasta	wt.% das fases cristalinas			
	β -TCP	HA	Ca ₉ Fe(PO ₄) ₇	Hem
HATCP	31,6	68,4	-	-
FeHATCP	-	65,8	31,6	2,5

A partir da Tabela 7, é possível verificar que, apesar de se ter partido de proporções diferentes de pós iniciais, as pastas finais (pura e dopada) não apresentam diferenças significativas na proporção de fases cristalinas (HA e β -TCP/Ca₉Fe(PO₄)₇). Na mistura da FeHATCP, apesar de não ser visível a presença da fase β -TCP, esta fase encontra-se na mistura, dado que é uma das fases cristalinas secundárias formadas no pó FeHA (Figura 21, Tabela 6). Mas, uma vez que esta fase (β -TCP) está em pequenas quantidades no pó FeHA (3,9 wt.%) e os picos da sua ficha PDF são muito próximos dos da ficha PDF da fase Ca₉Fe(PO₄)₇, a sua quantificação não foi possível.

Um passo importante no processo de impressão de *scaffolds* por robocasting é a otimização das propriedades reológicas das pastas, ou seja, obter uma pasta capaz de fluir através de orifícios de pequeno diâmetro (<500 μ m) e simultaneamente manter a sua estrutura após a deposição, de forma a garantir a manutenção da geometria e estrutura interna do *scaffold*.

Em pastas cerâmicas, estas propriedades viscoelásticas são normalmente atingidas com o uso de suspensões concentradas em sólidos e adição de aditivos, como espessantes e floculantes.¹²⁸ A natureza destes aditivos não tem de ser não-tóxica, uma vez que os *scaffolds* são comumente sujeitos a um processo de sinterização, onde estes são eliminados. No presente trabalho, em que os *scaffolds* obtidos são livres do processo de sinterização, a viscoelasticidade das pastas e a sua estabilidade estrutural são asseguradas pela capacidade de gelificação/polimerização dos compósitos de quitosano/CaP com um agente de reticulação, a genipina, bem como com a quantidade de sólidos incorporados na pasta. Sabe-se também de trabalhos anteriores, que o processo de gelificação pode ser mais rápido na presença de pós à base de CaPs devido às ligações iônicas entre os grupos amina do quitosano e os grupos fosfatos dos CaPs.^{79,128}

Com o objetivo de avaliar a capacidade de gelificação dos pós puros e dopados na presença de quitosano, bem como da levofloxacina, foram efetuadas medidas do módulo elástico (G') e viscoso (G'') ao longo do tempo (tempo total de ensaio 1h), em pastas contendo 30 vol.% e 25 vol.% de sólidos, mantendo as proporções de pós usadas ao longo do trabalho (Tabela 3, secção 2.2.2). Os resultados estão apresentados na Figura 27.

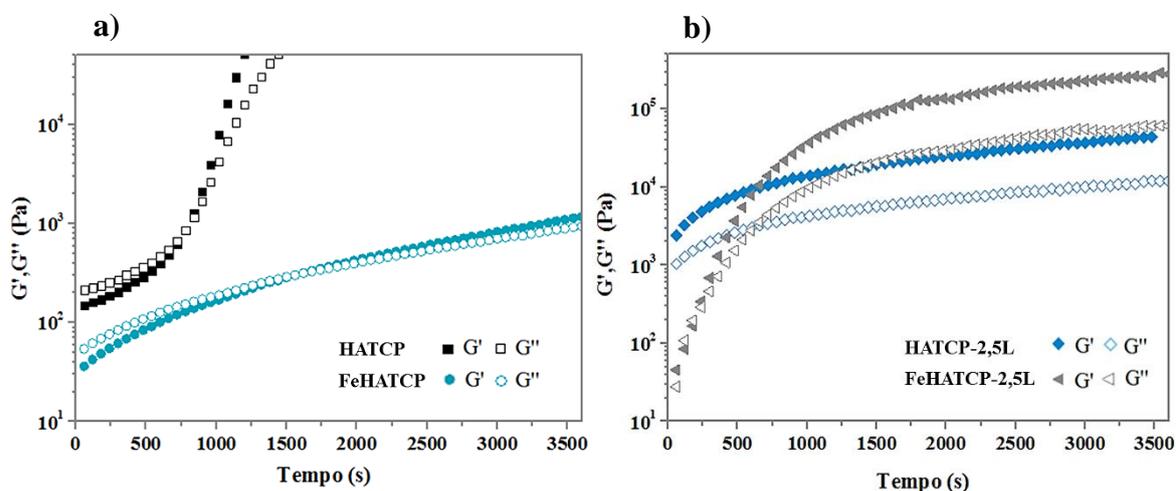


Figura 27 - Evolução do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') com o tempo, a uma temperatura de 25°C para: **(a)** pastas puras (HATCP) e dopadas (FeHATCP) com 30 vol.% de sólidos e **(b)** pastas puras (HATCP-2,5L) e dopadas (FeHATCP-2,5L) na presença de levofloxacina com 25 vol.% de sólidos. Todas as medidas foram feitas em pastas na ausência de genipina.

Dos resultados obtidos é possível observar que a pasta preparada com pós puros (HATCP) apresenta um rápido aumento de G' e G'' , com um ponto de gelificação (ponto em que G' intersesta G'') a aproximadamente 750 s (~13 min) (Figura 27a). Comparativamente, a pasta preparada com os pós dopados apresenta um crescimento gradual e bastante menos acentuado de G' e G'' , com o ponto de gelificação aproximadamente aos 1500s (~25 min) (Figura 27a). Este resultado permite concluir que, mesmo na ausência de genipina, os pós de HATCP promovem a gelificação iónica do quitosano, tal como verificado em estudos anteriores, e explica a impossibilidade da adição de concentrações de sólidos superiores a 34 vol.% nas pastas preparadas com pós puros. A rápida velocidade de gelificação desta pasta, origina valores muito elevados de G' ao fim de poucos minutos ($>10^4$ para 17 min) impedindo a incorporação adicional de sólidos. O mesmo não se verifica com a pasta preparada com os pós dopados, onde foi possível a incorporação de 40 vol.% de sólidos. Este resultado poderá dever-se ao facto dos pós puros serem mais solúveis do que os pós dopados, disponibilizando mais iões fosfato para a solução que irão contribuir para a reticulação do quitosano.^{79,128}

Quando se incorpora levofloxacina (Figura 27b) nas pastas preparadas com os pós puros (HATCP-2,5L) e dopados (FeHATCP-2,5L), verifica-se que nas pastas puras a gelificação do quitosano já ocorreu ($G' > G''$), e nas pastas dopadas ocorre gelificação logo no início do ensaio. Este resultado indica que a velocidade de gelificação para ambas as pastas na presença de levofloxacina é superior às composições HATCP e FeHATCP sem levofloxacina, mesmo com concentrações de sólidos inferiores (25 vol.%, Figura 27a). O facto destas composições apresentarem uma velocidade de gelificação superior que as pastas HATCP e FeHATCP pode ser devido à capacidade de interação que as fluoroquinolonas, nomeadamente a levofloxacina, têm com múltiplos catiões (Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+}), formando quelatos entre a quinolonas e os catiões.¹⁴²

Um estudo recente, apresentado por Marques et al.¹²⁸ mostrou que temperaturas entre 35-40°C eram adequadas para a reticulação do quitosano na presença de genipina. Seguindo este princípio, para verificar o efeito da temperatura na velocidade de gelificação/polimerização das pastas, avaliou-se o G' e G'' ao longo do tempo em pastas de HATCP, FeHATCP e FEHATCP na presença de levofloxacina com 20 vol.% de sólidos numa solução de quitosano (5 wt.%) na presença de genipina a 25°C e 37°C. Foi usada esta concentração de sólidos neste estudo, uma vez que, para concentrações acima deste valor,

na presença de genipina, o ponto de gelificação já tinha sido ultrapassado no início do ensaio ($G' > G''$). Os resultados estão apresentados na Figura 28.

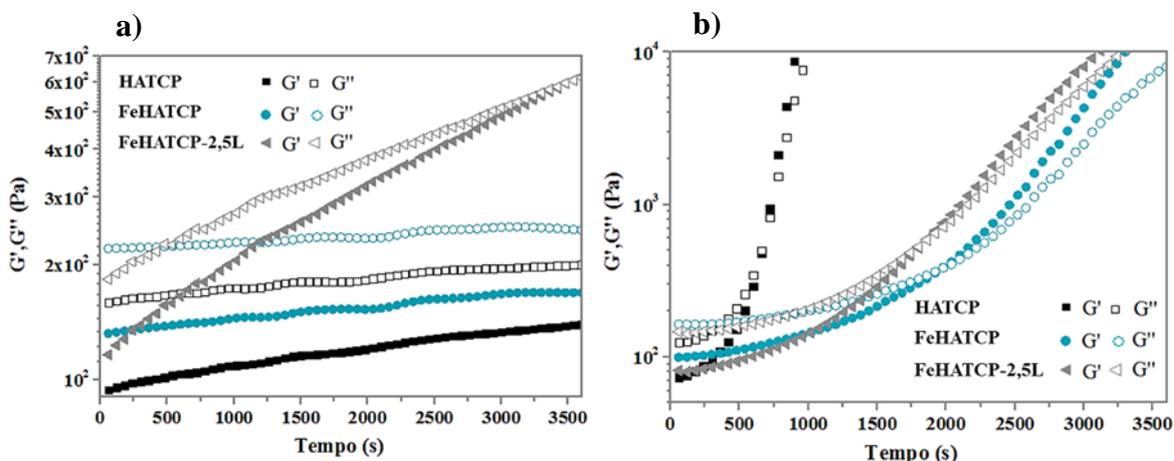


Figura 28 - Evolução do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') com o tempo, das pastas puras (HATCP) e dopadas (FeHATCP) com 20 vol.% de pó disperso em 80 vol.% de uma solução de quitosano (5 wt.%) na presença de genipina, a uma temperatura de 25°C (a) e a uma temperatura de 37°C. (b).

Dos resultados obtidos, é possível observar que a uma temperatura de 25°C (Figura 28a), nas pastas obtidas a partir dos pós puros (HATCP) e dopados (FeHATCP) há apenas um ligeiro aumento do módulo elástico e viscoso ao longo do tempo, sem atingir o ponto de gelificação durante o tempo total de ensaio. Este resultado pode aparentemente parecer contraditório com os resultados da Figura 27, uma vez que para 30 vol.% de sólidos as pastas atingiram o ponto de gelificação durante o tempo do ensaio, mesmo na ausência de genipina. A diminuição da concentração de sólidos de 30 para 20 vol.% e o fator diluição provocado pela adição da solução de genipina poderão explicar este facto. A pasta obtida com os pós dopados na presença de levofloxacina (FeHATCP-2,5L) apresenta um aumento gradual do G' e G'' com o tempo, sendo visível o ponto de gelificação após cerca de 60 min. O facto da pasta FeHATCP-2.5L apresentar uma gelificação ligeiramente mais rápida que as pastas HATCP e FeHATCP, pode ser devido à capacidade das fluoroquinolonas, nomeadamente a levofloxacina, formarem quelatos entre a quinolonas e múltiplos catiões (Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+}), tal como mencionado anteriormente.

Aumentando a temperatura do ensaio para 37°C (Figura 28b) o processo de reticulação do quitosano pela genipina é mais acentuado para todas as pastas, o que indica que para

ocorrer polimerização do quitosano na presença de genipina (formando ligações covalentes), é necessário submeter os *scaffolds* a temperaturas superiores à temperatura ambiente, em concordância com trabalhos anteriores.¹²⁸ A pasta preparada com os pós puros (HATCP) é a que apresenta uma velocidade de reticulação mais rápida, seguida da pasta FeHATCP-2,5L, e por fim da FeHATCP. Tal como mencionado anteriormente, a velocidade de reticulação da pasta HATCP está provavelmente relacionada com a maior solubilidade dos pós puros em comparação com os pós dopados, disponibilizando mais grupos fosfato para a solução que poderão ligar-se aos grupos amina do quitosano, levando consequentemente a uma reticulação mais rápida.

De forma a avaliar a capacidade de retenção dos filamentos das pastas finais durante a impressão por robocasting, foi efetuado um ensaio de varrimento de amplitudes (*amplitude sweep test*). A Figura 29 apresenta o módulo elástico (G') em função da tensão de corte, para as pastas obtidas com os pós puros (HATCP) com um total de 34 vol.% de sólidos, e para as pastas FeHACP e FeHATCP-2,5L com uma concentração de sólidos de 40 vol.%. Todas as medidas foram efetuadas a 25°C, 10 min após a adição da genipina (HATCP-10min, FeHATCP-10min, FeHATCP-2,5L-10min) e 45 min após a adição da genipina para a pasta FeHATCP (FeHATCP-45min).

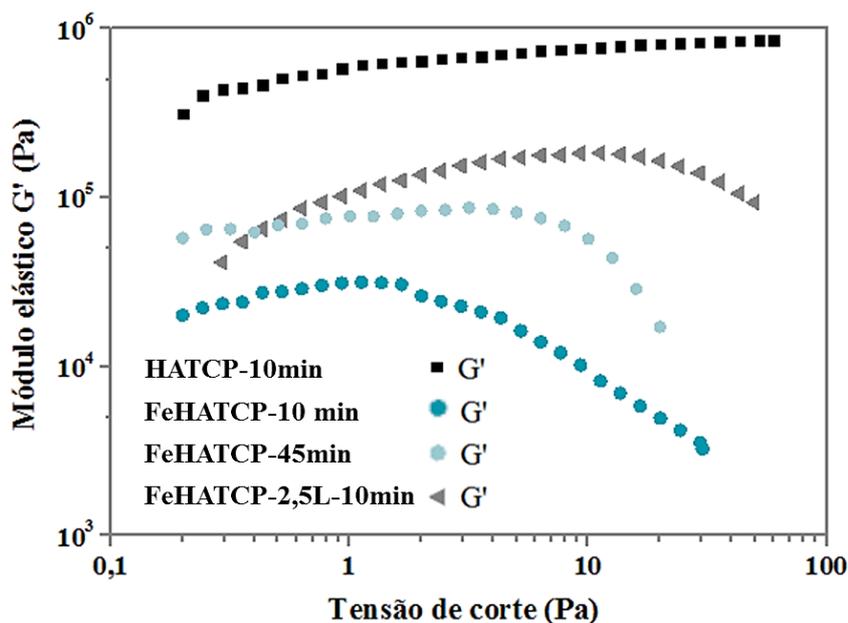


Figura 29 - *Amplitude sweep* das pastas finais puras e dopadas, com 34, 40 vol.% sólidos, respetivamente, a 25°C, 10 min após a adição da genipina (HATCP-10min, FeHATCP-10min, FeHATCP-2,5L-10min) e 45 min após a adição da genipina (FeHATCP-45min).

Pode verificar-se, a partir da Figura 29, que a pasta pura é a que apresenta um módulo elástico mais elevado ($\sim 10^5$ - 10^6 Pa) e a que permanece estável ao longo de todo o intervalo de tensões de corte aplicadas (região de viscoelasticidade linear mais alargada), indicando que os filamentos depositados serão mecanicamente estáveis e capazes de suportar o seu próprio peso durante a impressão. A FeHATCP-2,5L-10min apresenta-se estável numa gama de valores de tensão de corte inferior (0,1-11 Pa), com valores de G' superior a 10^5 Pa, adequados para impressão segundo a literatura.¹⁴³ Já a FeHATCP-10min é a que apresenta um menor módulo elástico ($\sim 11^4$ Pa), menor região de viscoelasticidade linear, valores não adequados para impressão por robocasting. Fazendo a medição para a mesma pasta após 45 minutos da adição da genipina, FeHATCP-45min, esta apresenta-se linear numa gama de valores de 0,2-4 Pa e com um valor de G' perto de 10^5 Pa. Tendo velocidades de gelificação diferentes na presença da genipina como visto anteriormente, as pastas atingem valores de módulo elástico distintos para o mesmo tempo de medição. Por este motivo, as pastas HATCP e FeHATCP-2,5L foram impressas logo após a preparação e respetiva adição de genipina, enquanto a pasta obtida com os pós dopados (FeHATCP) foi impressa 30-45 min após a adição de genipina, para garantir a integridade mecânica dos filamentos durante e após impressão.

Os efeitos sinérgicos do processo de reticulação iónica, pelos grupos fosfato, e covalente pela genipina, mencionados anteriormente, poderão explicar o módulo elástico (G') superior das pastas puras quando comparado com as dopadas, para o mesmo tempo de reação. Por outro lado, a presença de maiores quantidades de partículas de pós, como é o caso das pastas com pós dopados (40 vol.%), relativamente às pastas dos pós puros (34 vol.%), poderão interferir no processo de gelificação. A elevada concentração de partículas poderá causar ruturas locais da estrutura do gel, reduzindo a liberdade das cadeias poliméricas de quitosano na procura de uma ligação ordenada com a genipina, em concordância com os resultados obtidos na Figura 29.¹²⁸ A presença de levofloxacina nas pastas preparadas com pós dopados contribui favoravelmente para o processo de gelificação, em concordância com os resultados apresentados na Figura 28.

3.3. Caracterização dos *scaffolds*

Os *scaffolds* provenientes das pastas preparadas com os pós puros (HATCP) apresentam uma cor azulada devido à genipina, enquanto os *scaffolds* obtidos a partir das pastas preparadas com os pós dopados (FeHATCP) apresentam uma cor avermelhada devido à presença do ferro. Para ambas as composições, foram impressos *scaffolds* com diferentes tamanhos de poro, ou seja, 300 μm , 500 μm e um gradiente de porosidade. As diferentes estruturas dos *scaffolds* impressos por robocasting e secos a 40°C estão presentes na Figura 30.

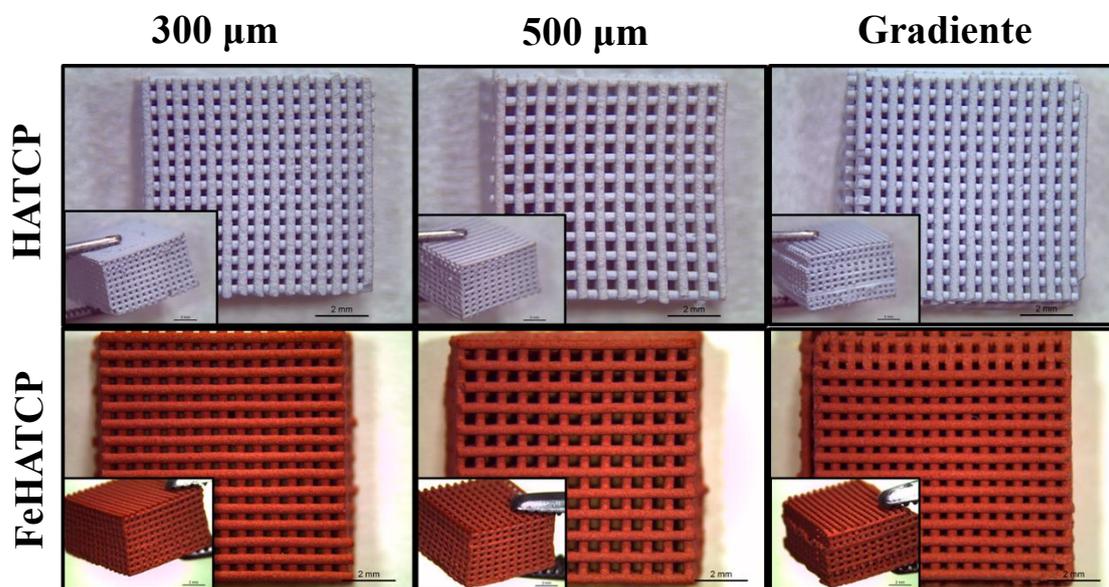


Figura 30 - *Scaffolds* puros (HATCP) e dopados (FeHATCP), com diferentes tamanhos de poro, obtidos por robocasting. As imagens, obtidas por uma lupa, são compostas por uma vista de topo (imagem maior) e por uma vista 3D (imagem menor). Escala de 2 mm.

A Figura 31 mostra as micrografias obtidas por SEM dos *scaffolds* obtidos com pós puros (HATCP) e dopados, com e sem levofloxacina (FeHATCP-2,5L e FeHATCP), para todos os tamanhos de poro testados, 300 μm , 500 μm e gradiente

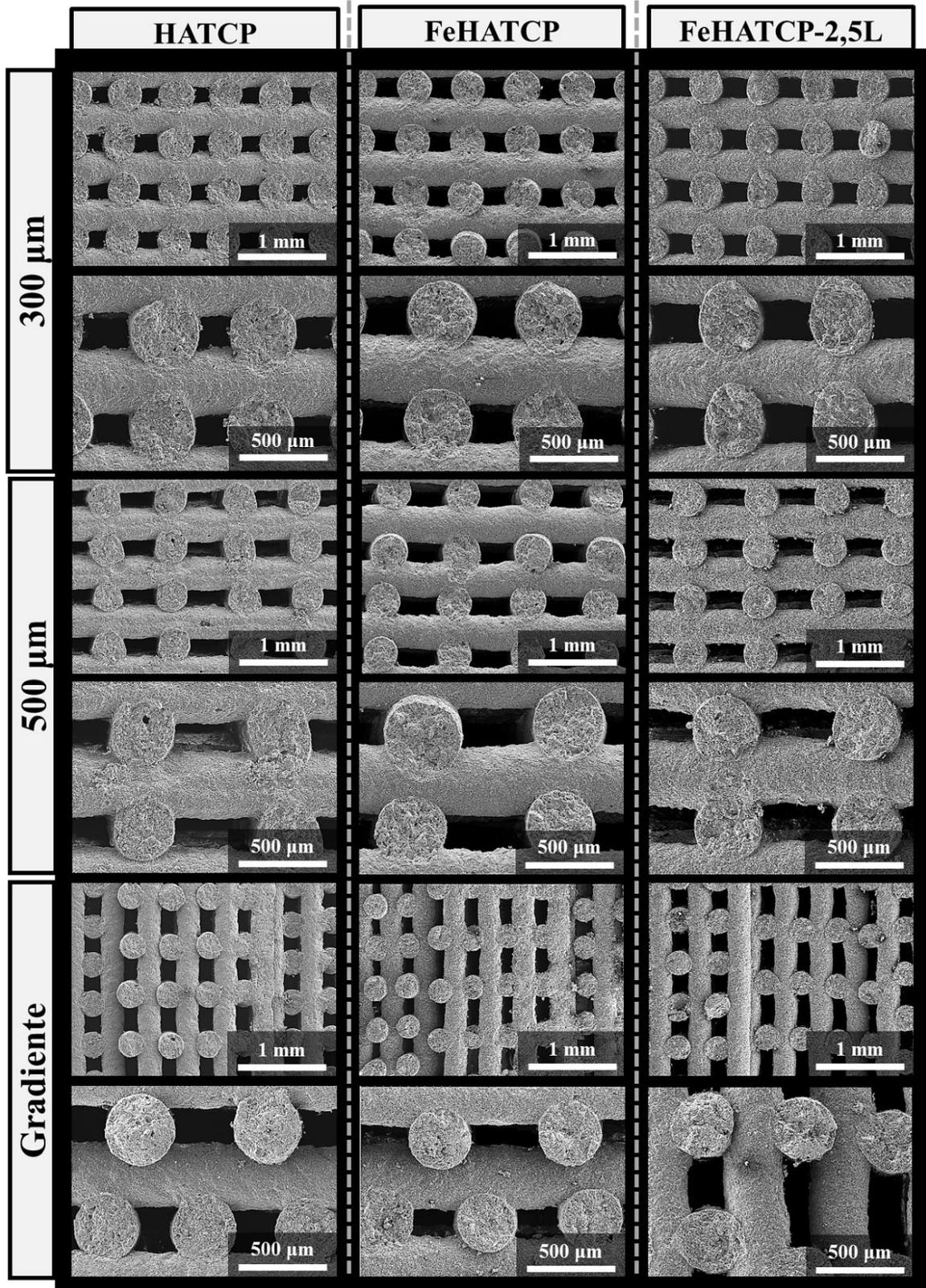


Figura 31 - Micrografias de SEM dos *scaffolds* HATCP, FeHATCP e FeHATCP-2,5L, para os diferentes tamanhos de poro. As imagens apresentam uma vista lateral dos *scaffolds*.

Da análise das figuras pode verificar-se que todas as estruturas mantiveram a sua forma após a deposição dos filamentos, indicando que os filamentos depositados foram capazes de suportar o peso das sucessivas camadas sem se deformarem significativamente. Observa-se ainda uma boa adesão entre os filamentos das camadas adjacentes. Estas características permitem prever que, quando sujeitos a uma força mecânica de compressão, a transferência de cargas seja idêntica em toda a estrutura dos *scaffolds*, conferindo-lhes uma boa estabilidade mecânica. Uma vez que estes *scaffolds* não são submetidos a um processo de sinterização, a integridade mecânica durante e após impressão, é atingida pela elevada concentração de sólidos nas pastas e pela polimerização do quitosano. Desta maneira, a concentração de sólidos utilizada neste trabalho para a preparação das diferentes pastas foi suficiente para não provocar grandes níveis de retrações durante a secagem dos *scaffolds*.

Através do comportamento reológico das pastas (Figura 29), 10 minutos após a sua preparação, seria de esperar que os *scaffolds* obtidos com a pasta contendo os pós dopados (FeHATCP), apresentassem filamentos com algum grau de deformação e menor capacidade de suporte, uma vez que esta apresentou um menor módulo elástico e estabilidade num curto intervalo de tensões de corte. No entanto, devido ao facto dos tempos de impressão das pastas HATCP e FeHATCP-2.5L terem sido impressas logo após a preparação, enquanto a pasta obtida com os pós dopados (FeHATCP) foi impressa 30-45 min após a adição de genipina, foi possível garantir a integridade mecânica dos filamentos durante e após impressão, não havendo por isso diferenças na macroestrutura entres os *scaffolds*. Estes resultados corroboram os resultados obtidos na reologia, nomeadamente os valores de G' para as amostras HATCP-10min, FeHATCP-2.5L-10min e FeHATCP-2.5L-45min (Figura 29 secção 3.2).

A microporosidade dos filamentos nos *scaffolds* também é importante no seu desempenho, uma vez que os microporos também permitem a adesão, proliferação e diferenciação celular, bem como a adsorção de nutrientes, promovendo a formação de novo tecido ósseo.⁴⁴ A Figura 32 mostra a microestrutura à fratura (interior do filamento) e à superfície dos filamentos, para os *scaffolds* HATCP, FeHATCP e FeHATCP-2,5L. Optou-se por apresentar apenas as imagens relativas aos *scaffolds* com porosidade de 300 μm , pois as imagens das restantes porosidades apresentam características morfológicas muito idênticas.

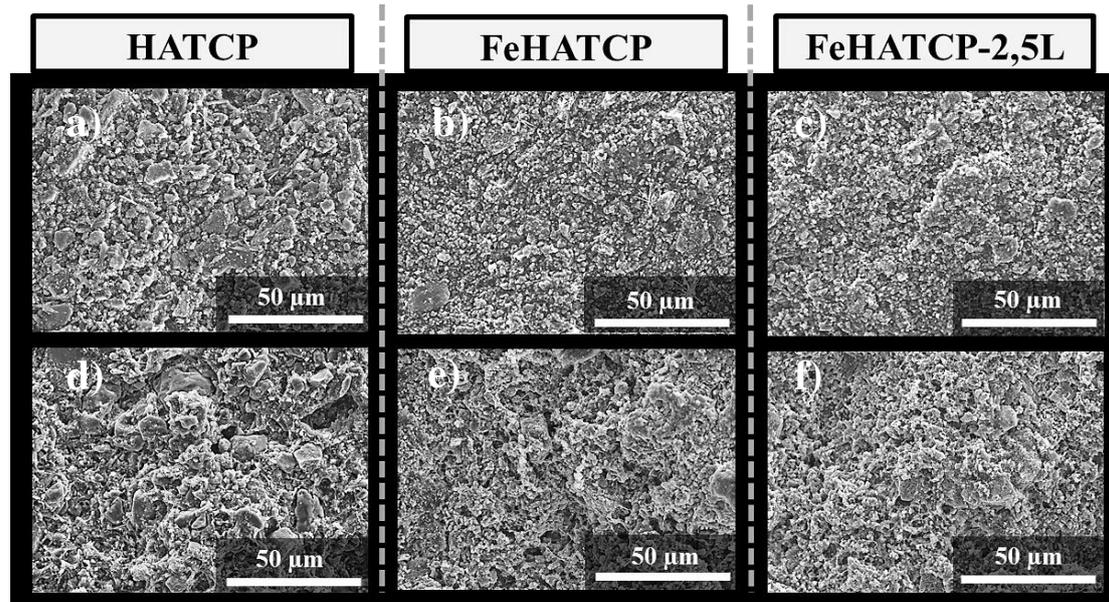


Figura 32 – Imagens SEM da microestrutura dos *scaffolds* HATCP, FeHATCP, FeHATCP-2,5L, com um tamanho de poro de 300: (a,b,c) superfície do filamento e (d,e,f) interior do filamento.

As micrografias correspondentes às amostras FeHATCP e FeHATCP-2.5L apresentam microestruturas semelhantes à superfície do filamento (Figura 32 b-c). Na composição HATCP é possível observar partículas com dimensões mais variadas, isto é, uma maior gama de tamanhos, em concordância com os resultados obtidos na análise granulométrica e nas micrografias de SEM dos pós (Figura 24 e Figura 25, respetivamente). Na superfície de fratura verifica-se a existência de microporosidade para todas as composições (Figura 32 d-f), com diâmetros de poro aparentemente superiores para os *scaffolds* produzidos com pós puros (HATCP, Figura 32d), resultantes de um pior empacotamento de partículas. Além disso, verificou-se que contrariamente ao ocorrido no trabalho desenvolvido por Marques A.C. et al.¹²⁸, a incorporação de levofloxacina (Figura 32 c, f) não altera a homogeneidade das pastas comparativamente à FeHATCP (Figura 32 b-e), nem a estrutura dos *scaffolds* (Figura 31).

A distribuição da levofloxacina no interior e à superfície dos filamentos dos *scaffolds* FeHATCP-2,5L, foi avaliada por microscopia de fluorescência. Os resultados estão apresentados na Figura 33. Os canais utilizados para a aquisição das imagens foram o DAPI (azul), GFP (verde) e Rhodamine (laranja). Visto que todos os compostos presentes na composição das pastas apresentavam autofluorescência (ferro, quitosano e

levofloxacina), foi usado um *scaffold* FeHATCP (controle) para comparar com um *scaffold* FeHATCP-2,5L, de modo a perceber o canal responsável pela detecção da fluorescência da levofloxacina.

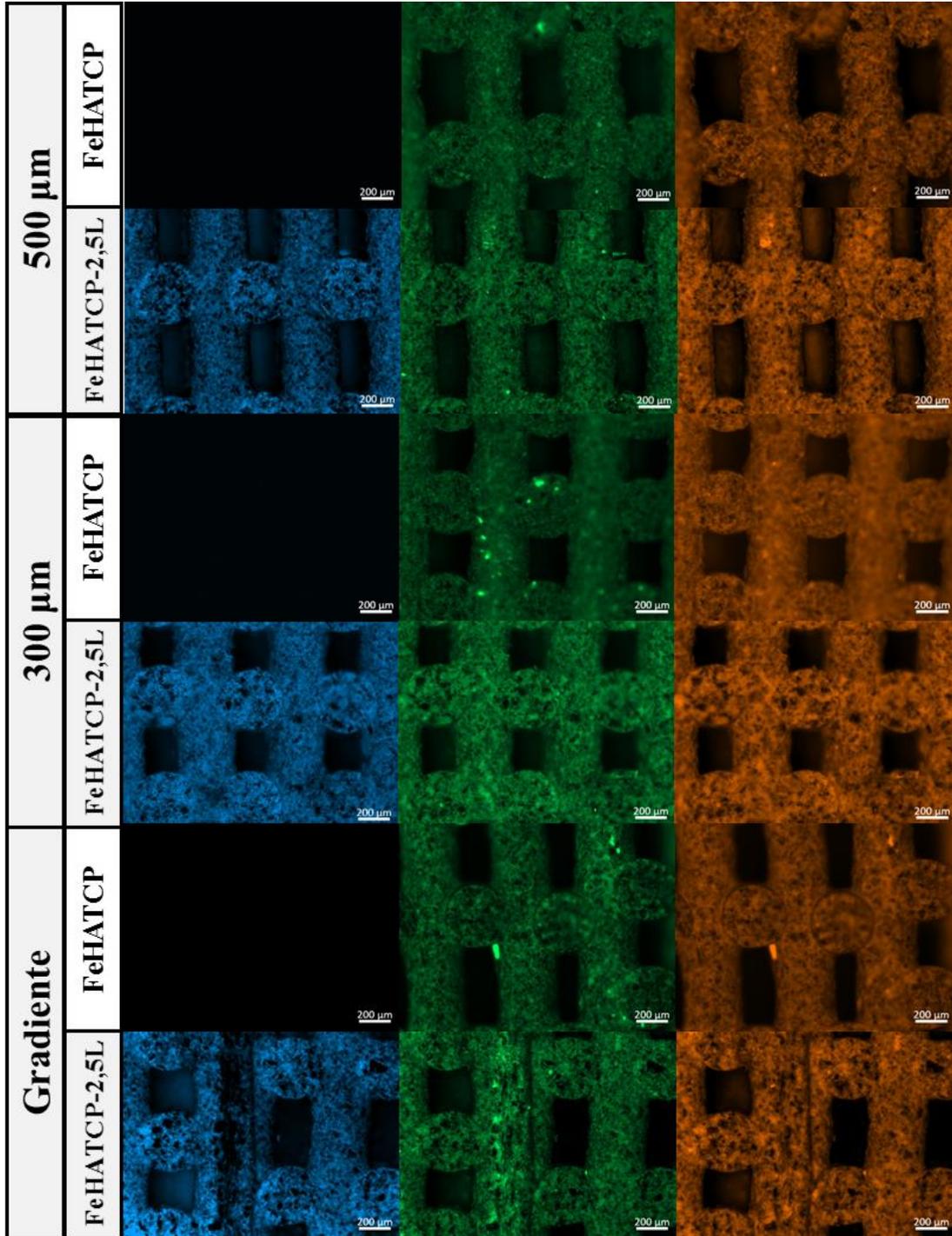


Figura 33 - Imagens de fluorescência dos *scaffolds* FeHATCP-2,5L, para os diferentes tamanhos de poro. Os canais utilizados são o DAPI (azul), GFP (verde), Rodhamine (laranja).

Comparando os *scaffolds* com e sem levofloxacina, para todas as porosidades estudadas, conclui-se que a levofloxacina emite fluorescência no azul, não sendo possível saber o composto responsável pela fluorescência no verde e laranja (Figura 33). De uma forma geral, é visível que todos os *scaffolds* com as diferentes porosidades apresentam uma distribuição homogênea da levofloxacina por toda a estrutura do *scaffold*.

Para se obter *scaffolds* com um bom desempenho como substitutos ósseos, estes devem possuir uma resistência à compressão suficiente para suportar as cargas impostas e ainda um módulo de Young próximo do osso que se está a substituir, de forma a evitar problemas de *stress shielding*. Para tal, realizaram-se ensaios à compressão e calculou-se o módulo de Young dos *scaffolds* obtidos com pós puros (HATCP), dopados sem e com levofloxacina (FeHATCP e FeHATCP-2,5L) e dopados com levofloxacina não encapsulada e encapsula (FeHATCP-0,1L e FeHATCP-0,1LC), para os três tipos de porosidade estudados. Na Figura 34 são apresentados os resultados da resistência à compressão em função do tamanho de poro dos *scaffolds*.

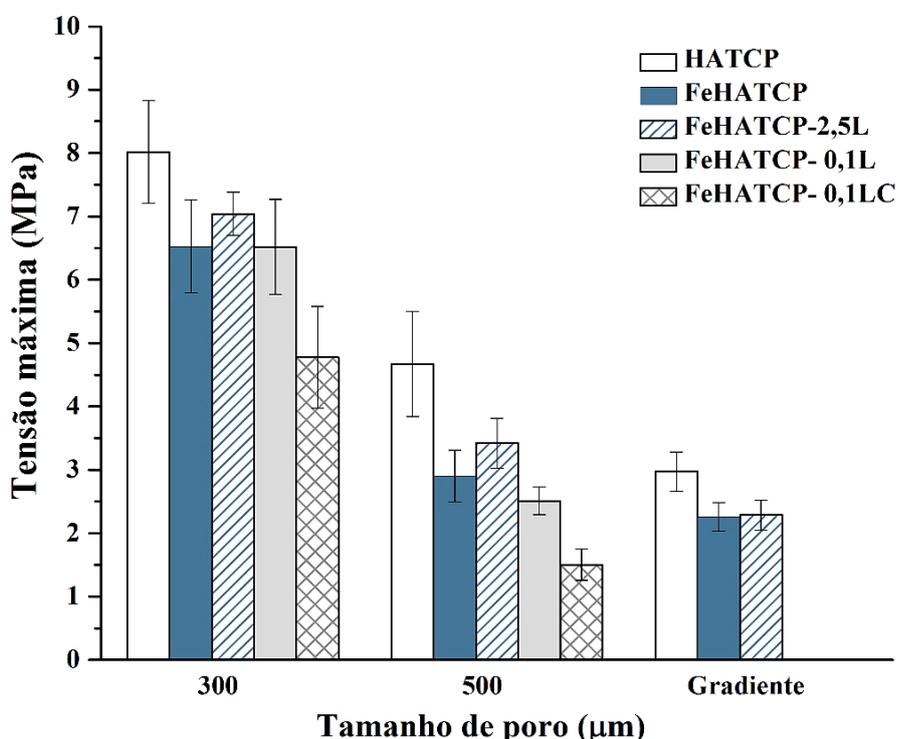


Figura 34 - Resistência à compressão dos *scaffolds* com diferentes composições, com tamanho de poro de 300 µm, 500 µm, e gradiente.

Como é possível observar pela Figura 34, verifica-se que, independentemente da composição, os *scaffolds* com um tamanho de poro de 300 μm apresentam valores superiores de resistência à compressão. Este comportamento era esperado, uma vez que quanto menor for o tamanho de poro e a porosidade total, mais densa fica a estrutura, levando a uma maior resistência. Ao contrário do que era esperado os *scaffolds* com gradiente de porosidade são os que apresentam valores inferiores de resistência à compressão. Este resultado poderá dever-se ao desnivelamento na interface entre as camadas de poro maior e menor, que provocava separação/deslizamento de camadas nos testes de resistência à compressão. Esta imperfeição entre as camadas de diferentes porosidades no *scaffold* de gradiente proveio do modelo CAD, que futuramente necessita de ser corrigido/aperfeiçoado.

Para a mesma porosidade, os *scaffolds* obtidos com os pós puros HATCP, apresentam valores de resistência à compressão superiores, quando comparados com as restantes composições. Este resultado não era esperado, uma vez que nas pastas preparadas com pós puros foi possível incorporar menos sólidos (34 vol.%) do que nas pastas preparadas com pós dopados (40 vol.%). No entanto, este resultado vai de encontro aos resultados obtidos na avaliação das propriedades reológicas das pastas finais (Figura 29, secção 3.2), onde foi adiantado que a elevada concentração de partículas poderá diminuir o grau de gelificação, causado por ruturas das cadeias poliméricas do quitosano que, conseqüentemente reduzem a força de gel.

Comparando os *scaffolds* com (FeHATCP-2,5L e FeHATCP-0.1L) e sem levofloxacina (FeHATCP), verifica-se que a presença do fármaco não altera significativamente o seu desempenho mecânico, podendo até dizer-se que os valores de resistência à compressão são superiores na presença de levofloxacina, possivelmente devido às suas ligações com iões Ca^{2+} e $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, já referidas nos ensaios reológicos (secção 3.2). Relativamente aos *scaffolds* obtidos com levofloxacina encapsulada (FeHATCP-0.1LC) e não encapsulada (FeHATCP-0.1L), observa-se claramente que para os tamanhos de poro testados, a presença das cápsulas deu origem a valores reduzidos de resistência à compressão. Este resultado poderá dever-se aos tamanhos elevados das cápsulas (tamanho médio 40 μm , ver Figura 15, secção 2.2.2) quando comparados com o tamanho médio de partícula dos pós (1-2 μm), dificultando a sua homogeneidade e empacotamento na pasta.

Dos diferentes *scaffolds* produzidos, excluindo o FeHATCP-0,1LC com um tamanho de poro de 500 μm , é possível concluir que para todos os outros *scaffolds* produzidos apresentam valores aceitáveis para aplicação como substitutos no osso trabecular (esponjoso), visto que a resistência à compressão deste se encontra na gama de 2-12 MPa (ver Tabela 1, secção 1.1.3). Além disso, é possível verificar que para os *scaffolds* com e sem levofloxacina, com um tamanho de poro de 500 μm , se conseguiu obter valores de resistência à compressão superiores (2,5 a 5,5 MPa) aos obtidos no trabalho de Marques A.C. et al. (1 a 2 MPa).¹²⁸

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados do módulo de Young dos *scaffolds*.

Tabela 8 - Módulos de Young obtidos para *scaffolds* com diferentes composições, com tamanho de poro de 300 μm , 500 μm , e gradiente.

<u>Tamanho de poro</u> (μm)	<u>Composição</u>	<u>Módulo de Young</u> (GPa)
300	HATCP	0,139 \pm 0,002
	FeHATCP	0,141 \pm 0,011
	FeHATCP-2,5L	0,171 \pm 0,005
	FeHATCP-0,1L	0,164 \pm 0,009
	FeHATCP-0,1LC	0,065 \pm 0,001
500	HATCP	0,079 \pm 0,004
	FeHATCP	0,047 \pm 0,008
	FeHATCP-2,5L	0,078 \pm 0,001
	FeHATCP-0,1L	0,052 \pm 0,001
	FeHATCP-0,1LC	0,036 \pm 0,001
Gradiente	HATCP	0,040 \pm 0,002
	FeHATCP	0,063 \pm 0,006
	FeHATCP-2,5L	0,084 \pm 0,005

De uma forma geral, os *scaffolds* com um tamanho de poro de 300 μm têm módulos de Young superiores, o que leva a querer que para além de ter melhor resistência à

compressão esta estrutura sofre menores deformações. Os valores do módulo de Young para as diferentes composições, independentemente do tamanho de poro, não apresentam diferenças significativas. A partir dos resultados obtidos, verifica-se que na maior parte dos *scaffolds* estudados os valores se encontram na gama de valores do módulo de Young do osso trabecular, que varia de 0,05 a 0,5 GPa (Tabela 1, sub-capítulo 1.1.3).

3.4. Ensaio *in vitro* de libertação de fármaco

Na Figura 35 está representada uma curva de calibração da levofloxacina calculada antes de cada medida, de forma a validar os resultados obtidos nos estudos de libertação. A curva é linear para uma gama de concentrações de 1,32 - 168,75 µg/mL de levofloxacina. Para a equação da curva o y é a absorvância obtida para uma solução de concentração x em µg/mL.

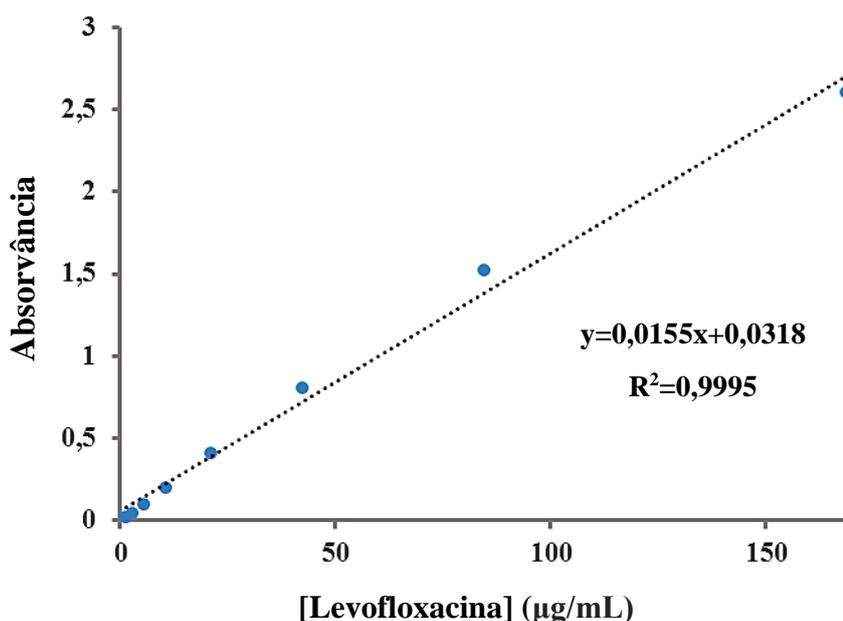


Figura 35- Curva de calibração da levofloxacina e respetiva equação de ajuste.

Os perfis de libertação da levofloxacina a partir dos *scaffolds* FeHATCP-2,5L, para as diferentes porosidades, determinados nos tempos 1, 2, 4, 6, 24, 48 e 72 h estão apresentados na Figura 36. A partir da Figura 36a é possível observar que ao fim de 72 h todos *scaffolds* libertaram toda a levofloxacina incorporada. Além disso, durante as 72 h de

ensaio o perfil de libertação dos diferentes *scaffolds* é idêntico. Contudo, verifica-se que entre os tempos $t=0$ h e $t=6$ h (Figura 36b) houve um *burst* inicial do fármaco, sendo que ao fim de 6 horas já praticamente 100% do fármaco tinha sido libertado pelos diferentes *scaffolds* em estudo. Tendo em conta que a composição dos *scaffolds* é igual, estes resultados indicam que a estrutura dos mesmos não interfere na libertação do fármaco.

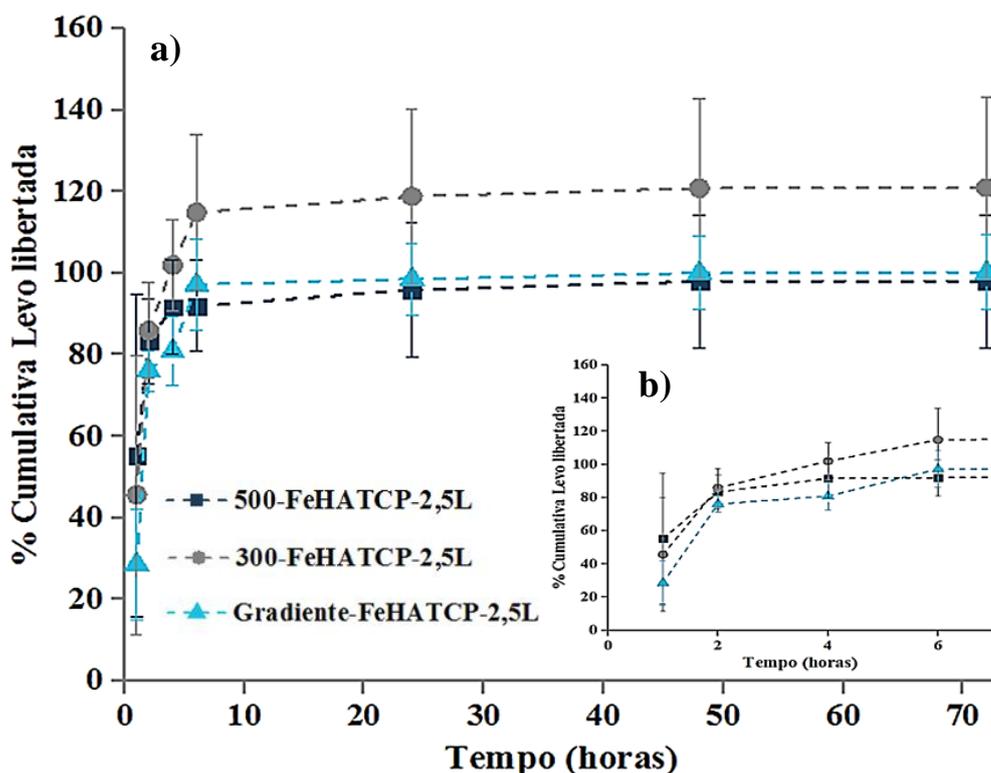


Figura 36 – (a) Perfil de libertação *in vitro* da levofloxacina a partir dos *scaffolds* FeHATCP-2,5L com diferentes porosidades durante 72 h; (b) Aproximação dos perfis para as primeiras 6 h.

Na Figura 37 estão apresentados os perfis de libertação dos *scaffolds* FeHATCP-0,1L e FeHATCP-0,1LC, para os diferentes tamanho de poro estudados neste trabalho, determinados nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 24 h. Através da observação da Figura 37a, verifica-se novamente que durante as 24 h de ensaio o perfil de libertação para os diferentes *scaffolds* é semelhante, libertando-se toda a levofloxacina ao final de 24 h. Além de se verificar que a estrutura do *scaffold* não altera o perfil de libertação, também se verifica que o facto da levofloxacina estar encapsulada não provocou diferenças significativas na velocidade de libertação do fármaco. Nas primeiras 6 horas a libertação ocorreu muito depressa, libertando-se mesmo praticamente toda a levofloxacina (Figura 37

b, c, d). No entanto, a partir da Figura 37b, o *scaffold* 300-FeHATCP-0,1LC, em comparação com todas as outras composições, aparenta ter uma tendência de libertação mais controlada ao longo do tempo, pois não apresenta uma libertação tão brusca durante a primeira hora. Contudo, seria necessário fazer um estudo mais detalhado para se perceber se o facto de o fármaco estar encapsulado, e mesmo impregnado numa estrutura com um tamanho de poro menor, poderia levar a uma libertação controlada.

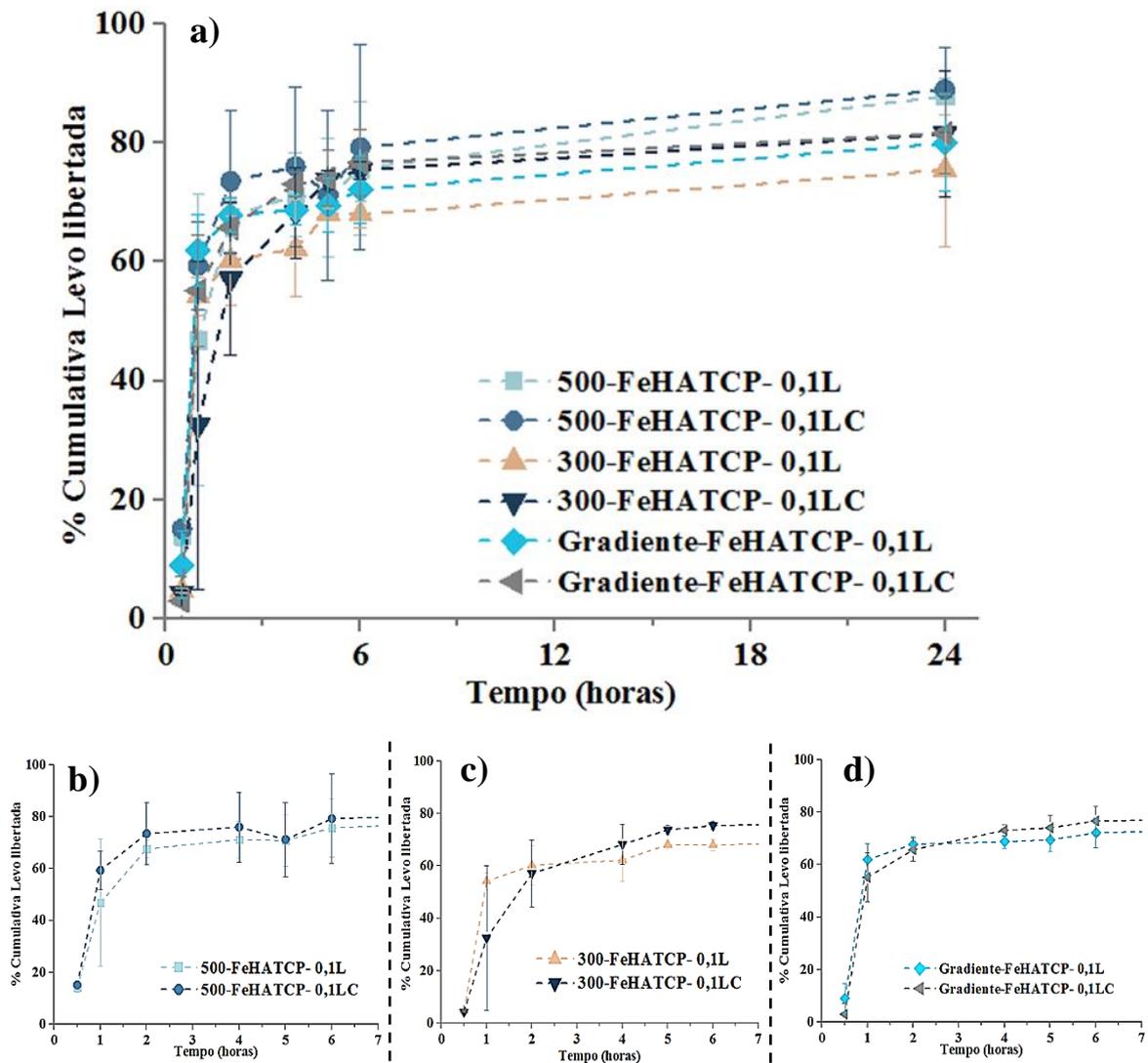


Figura 37 - (a) Perfil de libertação *in vitro* da levofloxacin a partir dos *scaffolds* FeHATCP-0,1L e FeHATCP-0,1LC, com diferentes porosidades. Aproximação dos perfis nas primeiras 6 h dos *scaffolds* com uma porosidade de: **(b)** 500 µm, **(c)** 300 µm e **(d)** gradiente.

3.5. Caracterização magnética e magneto-térmica

Devido ao acesso limitado a equipamentos de medidas magnéticas e magneto-térmicas, estas propriedades só foram avaliadas numa fase final do trabalho, nos pós sintetizados e nas pastas secas. De facto, a capacidade hipotérmica dos *scaffolds* depende da resposta magneto-térmica dos seus constituintes. Assim, foram avaliados inicialmente os pós que lhes deram origem, FeHA e FeTCP e a mistura de pós usada na pasta (FeHATCP). Após se ter verificado que a capacidade hipotérmica quer dos pós, quer da mistura de pós usada na obtenção das pastas, era pouco significativa, estudou-se o efeito da adição de nanopartículas magnéticas (NPMs) na magnetização e capacidade hipotérmica das pastas.

Na Figura 38 estão apresentadas as curvas de magnetização dos pós FeTCP, FeHA e da pasta FeHATCP (70 wt.% FeHA+ 30 wt.% FeTCP), bem como das pastas preparadas com os pós puros e dopados na presença de 1 wt.% de nanopartículas de magnetite (HATCP-1%Nano, FeHATCP-1%Nano), em função do campo magnético aplicado no intervalo [-4, 4] Tesla (1 Tesla=10000 Oe), à temperatura ambiente.

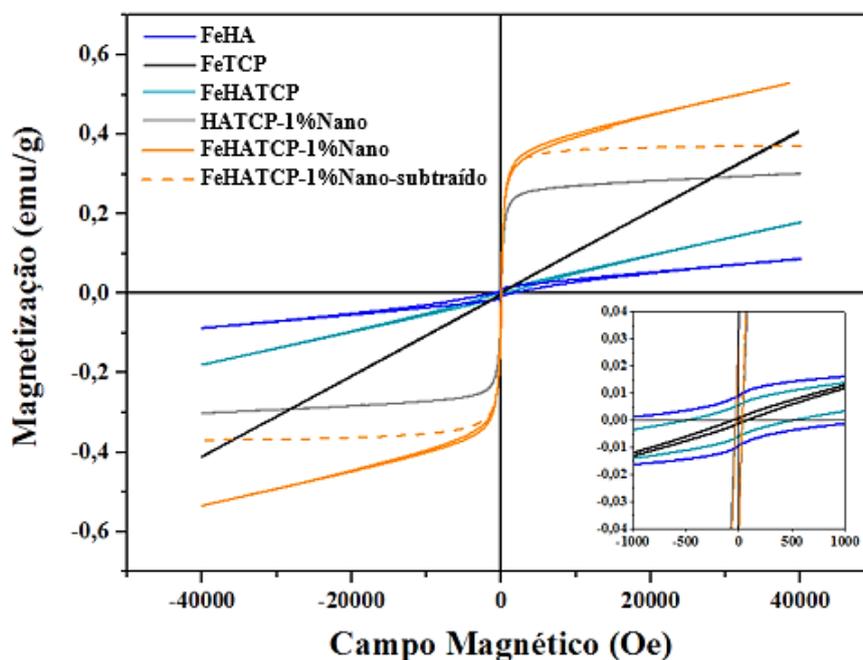


Figura 38 - Curva de magnetização da amostra FeHA, FeTCP, FeHATCP, HATCP-1%Nano e FeHATCP-1%Nano.

Os resultados mostram que as amostras FeHA, FeTCP e FeHATCP apresentam aparentemente uma curva característica de materiais antiferromagnéticos por duas razões: a tendência linear para campos magnéticos elevados e a histerese magnética para campos magnéticos baixos.^{87,144,145} O pó FeTCP é o que apresenta uma magnetização superior, de $\approx 0,4 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$, seguido do pó FeHATCP ($\approx 0,2 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$) e FeHA ($\approx 0,1 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$), para um campo magnético de 40000 Oe. A estrutura cristalina e a posição dos íons Ferro nessa estrutura poderão estar na origem da diferença dos valores de magnetização das amostras para o mesmo campo magnético. A histerese visível nas curvas, ou seja, a irreversibilidade verificada entre as curvas com campo crescente e campo decrescente, responsável pela abertura das curvas, acontece devido a processos de orientação dos momentos magnéticos ao longo da direção do campo magnético aplicado (por exemplo, movimento das paredes domínio).¹⁴⁵ Em particular, a histerese magnética observada nas curvas de magnetização dos pós FeHA e FeHATCP, pode ser atribuída à hematite, fase secundária, que à temperatura ambiente se encontra tipicamente num estado antiferromagnético (os *spins* dos elétrons são antiparalelos).^{87,144,145} A diminuição da histerese das curvas poderá estar associada à diminuição do tamanho das partículas.¹⁴⁶

A incorporação de 1 wt.% de nanopartículas de magnetite às pastas preparadas com os pós puros (HATCP-1%Nano) e dopados (FeHATCP-1%Nano) resulta numa magnetização de saturação de $\approx 0,3 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$ e uma magnetização de $\approx 0,5 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$ a um campo magnético de 40000 Oe, respetivamente. Relativamente ao seu comportamento magnético, ambas apresentam aparentemente uma curva característica de materiais superparamagnéticos, proveniente do comportamento característico das nanopartículas de magnetite (50 nm), como mostrado na Figura 39.^{87,145} Contudo, é visível que quando aplicado um campo superior a $\approx 5000 \text{ Oe}$, a curva da pasta FeHATCP-1%Nano apresenta uma linearidade, que poderá advir do comportamento antiferromagnético, da mistura de pós FeHATCP (Figura 38). De forma a perceber se o comportamento magnético da amostra que contém pós dopados com íons ferro e NPMs (FeHATCP-1%Nano) resulta apenas da contribuição do comportamento superparamagnético das nanopartículas magnéticas (visível na amostra com pós puros e NPMs, HATCP-1%Nano) juntamente com o comportamento antiferromagnético dos pós FeHATCP, subtraiu-se a contribuição linear da amostra FeHATCP à amostra FeHATCP-1%Nano, que resultou na curva FeHATCP-1%Nano-subtraído (Figura 38). O resultado mostrou uma magnetização de

saturação superior ($\sim 0,4 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$) à amostra HATCP-1%Nano que apresenta uma magnetização de saturação de $\sim 0,3 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$, para campos magnéticos de 40000 Oe. Este resultado permite concluir que, na amostra FeHATCP-1%Nano, além da contribuição do comportamento antiferromagnético e superparamagnético provenientes de cada um dos constituintes da mistura, existam outros fatores a influenciar a resposta magnética, uma vez que, se fosse apenas uma soma de ambos os comportamentos magnéticos, ao subtrair a componente antiferromagnética na amostra FeHATCP-1%Nano, esta apresentaria o mesmo comportamento e a mesma magnetização de saturação da amostra HATCP-1%Nano (superparamagnética). Embora sejam necessários ensaios adicionais para justificar as interações entre os pós dopados e as NMPs, os resultados obtidos vão de encontro aos resultados apresentados por Tampieri et al.¹⁷ Estes autores sintetizaram pós de HA dopados com Ferro na presença de magnetite como fase secundária e verificaram que a resposta magnética da mistura não provinha apenas da magnetite mas da contribuição da HA dopada com íons Ferro.

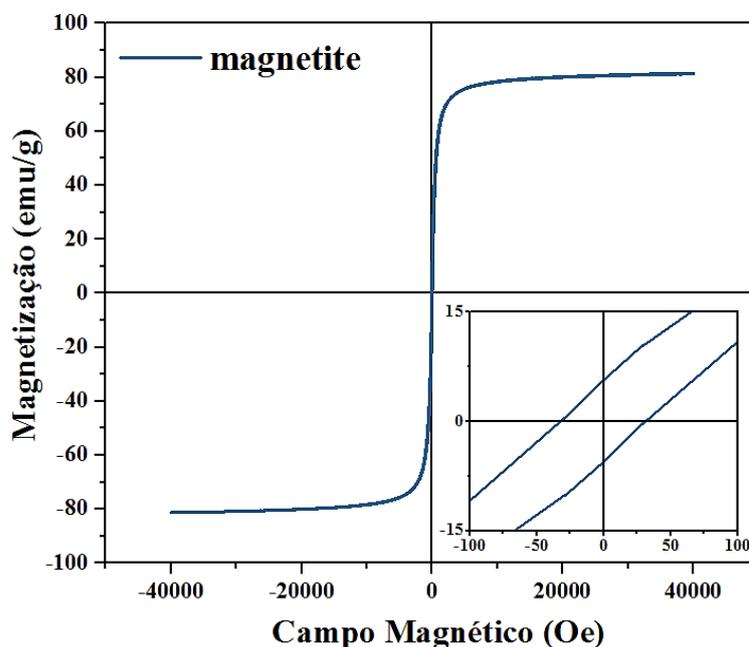


Figura 39 - Curva de magnetização das nanopartículas de magnetite.

A Figura 40 apresenta a evolução da temperatura em função do tempo de exposição ao campo magnético para os pós FeHA, FeTCP, bem como para as pastas na presença de 1 wt.% de nanopartículas magnéticas (HATCP-1%Nano e FeHATCP-1%Nano).

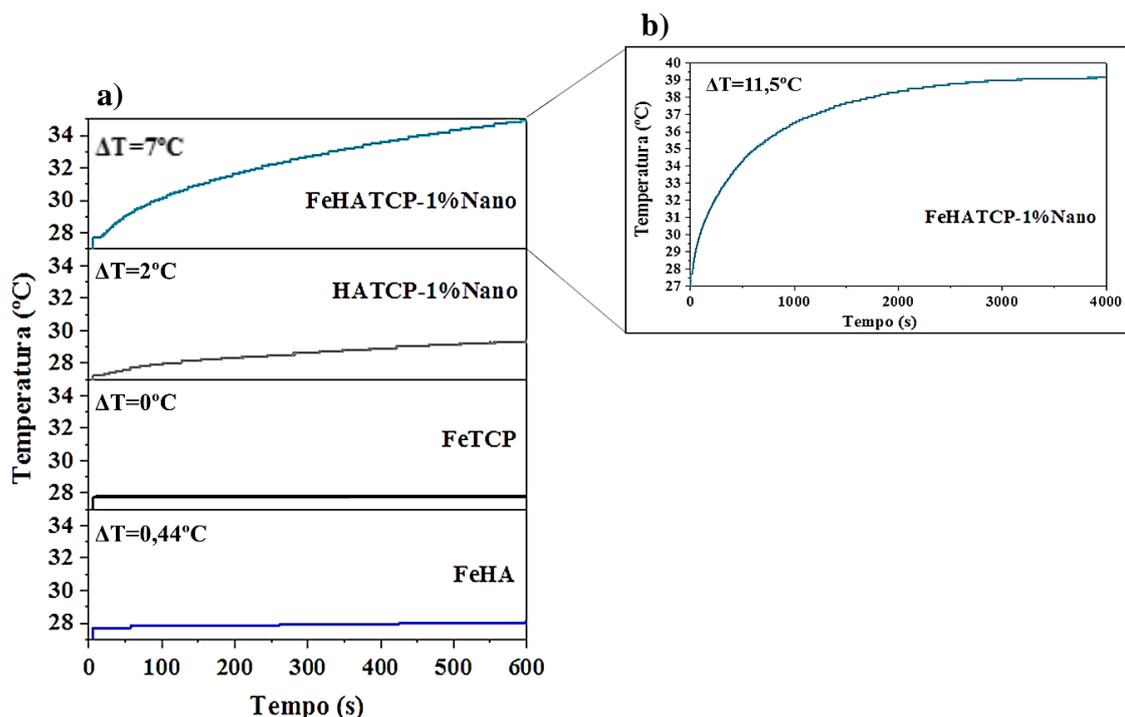


Figura 40 - a) Capacidade de aquecimento (hipertérmica) dos pós FeHA, FeTCP e das pastas HATCP-1%Nano e FeHATCP-1%Nano, num intervalo de tempo de 0-600s. **b)** Ampliação da curva FeHATCP-1%Nano para um intervalo de tempo de análise 0-4000s.

Ao fim de 10 minutos de exposição ao campo magnético, o pó FeTCP não apresentou alteração de temperatura e o pó FeHA apresentou apenas um aumento de temperatura de 0,44°C. Este resultado poderá ser justificado pelo facto da amostra FeHA apresentar uma área histerética maior (maior dissipação de energia) e a amostra FeTCP uma área histerética menor (pouca dissipação de energia), como observado na Figura 38.

A presença de nanopartículas magnéticas originou um $\Delta T=2^{\circ}\text{C}$ para as pastas com os pós puros (Figura 39a) e um $\Delta T=7^{\circ}\text{C}$ para as pastas com os pós dopados ao fim de 600 s (10 min). Após cerca de 1 h, estes últimos atingiram uma temperatura de 39°C (Figura 40b). É de salientar que estas temperaturas atingidas com a adição de 1 wt.% de nanopartículas magnéticas não são suficientes para obtenção de *scaffolds* para tratamento hipertérmico. Embora a capacidade hipertérmica seja pouco acentuada, estes resultados permitem concluir que, é bastante superior quando as nanopartículas magnéticas estão na presença de pós dopados com ião Ferro. Este efeito sinérgico entre pós dopados e nanopartículas magnéticas poderá ser vantajoso, uma vez que poderá permitir a adição de menor quantidade de nanopartículas magnéticas para obter a mesma resposta hipertérmica.

De facto, para esta quantidade de nanopartículas (1 wt.%) os resultados são bastante promissores, uma vez que outros estudos presentes na literatura onde usaram teores de nanopartículas acima de 5 wt.%, obtiveram um $\Delta T \cong 7-8$ °C após 10 minutos de exposição ao campo magnético alternado.^{88,95,147}

Capítulo 4

Conclusões e Trabalhos Futuros

4. Conclusões e trabalhos futuros

4.1. Conclusões

Os resultados obtidos ao longo das várias fases do trabalho apresentado nesta tese culminaram na obtenção de *scaffolds* compósitos multifuncionais à base de CaP/quitosano, por robocasting, com propriedades mecânicas adequadas para substituição óssea, sem utilização do processo de sinterização no seu fabrico.

Com o intuito de obter *scaffolds* capazes de ter, sob aplicação de um campo magnético, um desempenho biológico melhorado e uma possível resposta hipertérmica, foram obtidos com sucesso pós de β -TCP e HA ambos dopados com 6 mol% de íões ferro ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e Fe^{3+} respetivamente) e não dopados para comparação, pelo processo de precipitação em meio aquoso e posterior calcinação à temperatura de 1100°C. Relativamente à composição dopada do β -TCP (FeTCP), a adição de Fe na sua estrutura levou à formação da fase cristalina $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$. Os pós HA e FeHA apresentaram um pequeno teor de fases secundárias, β -TCP e β -TCP + hematite, respetivamente. A incorporação do íão Fe na estrutura cristalina do β -TCP e HA foi confirmada pelas alterações dos valores dos parâmetros de rede que pode ser relacionada com o menor tamanho do raio iónico do Fe relativamente ao cálcio, mais significativas no β -TCP. Além disso, em ambos os pós, HA e β -TCP, a adição de ferro levou a alteração da morfologia e do tamanho de partícula.

Para a eliminação do processo de sinterização na obtenção de *scaffolds* como substitutos ósseos, foram desenvolvidas pastas compósitas com características reológicas adequadas para impressão por robocasting, incorporando os pós calcinados a 1100°C e moídos, de forma a obter um tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas adequado, numa solução aquosa de quitosano. A viscoelasticidade das pastas e a sua estabilidade estrutural, durante e após impressão, foram asseguradas pela capacidade de gelificação/polimerização dos compósitos de quitosano com os pós à base de CaP, com a genipina como agente de reticulação, bem como pela quantidade de sólidos incorporados na pasta. A partir do comportamento reológico das pastas preparadas com os pós puros (HATCP) verificou-se que estes promovem a gelificação do quitosano, através de ligações iónicas entre os grupos fosfatos dos CaPs e os grupos amina do quitosano, pois estas pastas, mesmo sem genipina, apresentaram uma velocidade de gelificação superior às pastas preparadas com os pós

dopados (FeHATCP). Este resultado explicou a impossibilidade da adição de concentrações de sólidos superiores a 34 vol.% na preparação das pastas com os pós puros, comparativamente às pastas dopadas, onde foi possível incorporar 40 vol.% de sólidos. As propriedades mecânicas dos *scaffolds* foram alcançadas através da polimerização do quitosano por reticulação com genipina.

Para atuar também como tratamento local de infecções, foi incorporado um antibiótico nos *scaffolds*. Neste trabalho, foi usada a levofloxacina (2,5 wt.%) como fármaco modelo e foi incorporada durante a preparação das pastas que mantiveram a sua capacidade de impressão por robocasting. No entanto, a sua adição às pastas dopadas (FeHATCP-2,5L) levou a um aumento na velocidade de gelificação do quitosano, em relação às pastas sem levofloxacina (FeHATCP), que poderá ser justificável pela capacidade de interação entre as fluoroquinolonas e múltiplos cátions presentes na pasta (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}).

Para as composições estudadas, HATCP, FeHATCP e FeHATCP-2,5L, a polimerização do quitosano com a genipina foi mais acentuada a uma temperatura de 37°C. Apesar das diferentes pastas apresentarem comportamentos diferentes, todas elas apresentaram propriedades reológicas adequadas para impressão por robocasting.

Na etapa de fabrico dos *scaffolds* com diferentes tamanhos de poro (300 µm, 500 µm e um gradiente 300-500-300 µm no eixo dos zz) a partir das pastas anteriormente preparadas, não se observaram diferenças na macroestrutura dos *scaffolds* entre as diferentes composições. Contrariamente ao ocorrido no trabalho de Marques A.C. et al.¹²⁸, neste trabalho verificou-se que a adição da levofloxacina não provocou alterações estruturais nem morfológicas nos *scaffolds*. Todos os *scaffolds* apresentaram uma estrutura homogênea sem colapso dos filamentos, mantendo a sua forma após a impressão robótica. Para todas as composições, os *scaffolds* com o tamanho de poro inferior (300 µm) foram os que apresentaram melhores valores de resistência à compressão. Para uma mesma porosidade, os *scaffolds* obtidos com os pós puros apresentaram valores de resistência à compressão ligeiramente superiores aos *scaffolds* obtidos com os pós dopados, com e sem levofloxacina, em concordância com os resultados obtidos nos ensaios reológicos. No entanto, todas as composições estudadas com tamanhos de poro diferentes apresentam resistências mecânicas à compressão e módulos de Young dentro da gama de valores do osso trabecular. Além disso, a partir dos resultados obtidos, é possível verificar que os

valores de resistência à compressão dos *scaffolds* com poros de 500 μm , com e sem levofloxacina incorporada, obtidos neste trabalho (gama entre 2.5 a 5.5 MPa) são superiores aos valores obtidos no trabalho de Marques A.C. et al. (gama entre 1 a 2 MPa).¹²⁸

Todos os *scaffolds* carregados com levofloxacina apresentaram uma distribuição homogênea do fármaco. Nos ensaios de liberação do fármaco, todos os *scaffolds* exibiram uma velocidade de liberação rápida nas primeiras 6h, mais acentuada na 1ª hora de ensaio e isto independentemente da estrutura porosa do *scaffold* e do encapsulamento ou não do fármaco. Esta forma de incorporação do fármaco nos *scaffolds* apresenta-se assim muito promissora no tratamento/prevenção local de infecções, como solução alternativa ou complementar à administração convencional de fármacos.

Os pós de HA e β -TCP dopados com 6 mol% de Ferro mostraram ter resposta magnética, que poderá ser benéfica para acelerar o processo de regeneração óssea quando aplicado um campo magnético. No entanto, estes não apresentaram resposta magneto-térmica, ou seja, não se verificou aumento da temperatura dos pós ao longo do tempo (max. 10 minutos) não atingindo a temperatura desejada (40°C a 46°C) usada para tratamento hipertérmico. A incorporação de nanopartículas magnéticas (1 wt.%) à pasta preparada com a mistura de pós dopados deu origem a uma melhoria significativa da resposta magneto-térmica, que não se verificou quando adicionadas à pasta preparada com os pós puros. Apesar de não se terem atingido as temperaturas necessárias para hipertermia num intervalo de tempo aceitável, que pode ser colmatado com o aumento da quantidade de partículas magnéticas, o efeito sinérgico entre os pós dopados e as nanopartículas mostra a importância da presença do ferro nos pós à base de CaP. Estes resultados indicam que, para atingir uma determinada temperatura nos tratamentos hipertérmicos, será necessário adicionar menor quantidade de nanopartículas magnéticas nos *scaffolds* fabricados com pós dopados com íons ferro do que nos *scaffolds* fabricados com pós puros.

Os resultados mostraram que os *scaffolds* compósitos obtidos neste trabalho constituem uma abordagem muito promissora para regeneração óssea e tratamento local simultâneo de infecções e hipertermia.

4.2. Trabalhos Futuros

Apesar de os resultados obtidos ao longo desta dissertação serem promissores, existem ainda aspetos que precisam de ser clarificados, bem como sugestões para trabalhos futuros.

Deste modo sugere-se:

- Aumentar a quantidade de ferro a incorporar nas estruturas do β -TCP e da HA, e sintetizar os pós dopados sob outras condições de forma a induzir a formação de fases magnéticas, como por exemplo, a magnetite;
- Realização de Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) para quantificar o ferro presente nos pós;
- Realização de estudos magnéticos adicionais para comprovar os comportamentos magnéticos obtidos;
- Análises dos pós dopados por Microscopia Eletrónica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy*, TEM);
- Estudar as propriedades mecânicas e a degradação dos *scaffolds* em soluções simuladoras de plasma humano;
- Investigar a possibilidade de incorporar outros polímeros naturais na composição (fibras, por exemplo) das pastas, de forma a melhorar o desempenho mecânico dos *scaffolds*, sem alterar a sua arquitetura;
- Realização de testes biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Referências

- (1) 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.
- (2) Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011, 9 (1), 66.
- (3) Zhang, Y.; Zhai, D.; Xu, M.; Yao, Q.; Chang, J.; Wu, C. 3D-printed bioceramic scaffolds with a Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite interface for hyperthermia therapy of bone tumor cells. *J. Mater. Chem. B.* 2016, 4 (17), 2874–2886.
- (4) Fernandes, R.; Siegel, P.; Komarova, S.; Hilton, J.; Addison, C.; Ibrahim, M. F. K.; Werier, J.; Dennis, K.; Singh, G.; Amir, E.; et al. Future directions for bone metastasis research-Highlights from the 2015 bone and the Oncologist new updates conference (BONUS). *J. Bone Oncol.* 2016, 5, 57–62.
- (5) Ma, H.; Jiang, C.; Zhai, D.; Luo, Y.; Chen, Y.; Lv, F.; Yi, Z.; Deng, Y.; Wang, J.; Chang, J.; et al. A Bifunctional Biomaterial with Photothermal Effect for Tumor Therapy and Bone Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* 2016, 26, 1197–1208.
- (6) Hess, U.; Shahabi, S.; Treccani, L.; Streckbein, P.; Heiss, C.; Rezwani, K. Co-delivery of cisplatin and doxorubicin from calcium phosphate beads/matrix scaffolds for osteosarcoma therapy. *Mater. Sci. Eng. C.* 2017, 77, 427–435.
- (7) Wang, H.; Zhao, S.; Zhou, J.; Zhu, K.; Cui, X.; Huang, W.; Rahaman, M. N.; Zhang, C.; Wang, D. Biocompatibility and osteogenic capacity of borosilicate bioactive glass scaffolds loaded with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *J. Mater. Chem. B.* 2015, 3, 4377–4387.
- (8) Lin, K. F.; He, S.; Song, Y.; Wang, C. M.; Gao, Y.; Li, J. Q.; Tang, P.; Wang, Z.; Bi, L.; Pei, G. X. Low-Temperature Additive Manufacturing of Biomimic Three-Dimensional Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds for Bone Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016, 8 (11), 6905–6916.
- (9) Rambhia, K. J.; Ma, P. X. Controlled drug release for tissue engineering. *J. Control. Release.* 2015, 219, 119–128.
- (10) Wenk, E.; Meinel, A. J.; Wildy, S.; Merkle, H. P.; Meinel, L. Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering. *Biomaterials.* 2009, 30, 2571–2581.
- (11) Bracaglia, L. G.; Smith, B. T.; Watson, E.; Arumugasaamy, N.; Mikos, A. G.; Fisher, J. P. 3D printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds. *Acta Biomater.* 2017, 3–13.
- (12) Chen, M.; Le, D. Q. S.; Hein, S.; Li, P.; Nygaard, J. V.; Kassem, M.; Kjems, J.; Besenbacher, F.; Bünger, C. Fabrication and characterization of a rapid prototyped tissue engineering scaffold with embedded multicomponent matrix for controlled drug release. *Int. J. Nanomedicine.* 2012, 7, 4285–4297.

- (13) Habraken, W.; Habibovic, P.; Epple, M.; Bohner, M. Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future. *Mater. Today*. 2016, 19, 69–87.
- (14) Wilson, C. E.; Van Blitterswijk, C. A.; Verbout, A. J.; Dhert, W. J. A.; De Bruijn, J. D. Scaffolds with a standardized macro-architecture fabricated from several calcium phosphate ceramics using an indirect rapid prototyping technique. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2011, 22 (1), 97–105.
- (15) Bañobre-lópez, M.; Piñeiro-redondo, Y.; Sandri, M.; Tampieri, A.; Santis, R. De; Dediu, V. A.; Rivas, J. Hyperthermia Induced in Magnetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *IEEE Trans. Magn.* 2014, 50 (11), 1–7.
- (16) Ortolani, A.; Bianchi, M.; Mosca, M.; Caravelli, S.; Fuiano, M.; Marcacci, M.; Russo, A. The prospective opportunities offered by magnetic scaffolds for bone tissue engineering: a review. *Joints*. 2016, 4 (4), 228–235.
- (17) Tampieri, A.; D’Alessandro, T.; Sandri, M.; Sprio, S.; Landi, E.; Bertinetti, L.; Panseri, S.; Pepponi, G.; Goettlicher, J.; Bañobre-López, M.; et al. Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite. *Acta Biomater.* 2012, 8 (2), 843–851.
- (18) Campbell, R. B. Battling tumors with magnetic nanotherapeutics and hyperthermia: turning up the heat. *Nanomedicine*. 2007, 2 (5), 649–652.
- (19) Kumar, C. S. S. R.; Mohammad, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011, 63 (9), 789–808.
- (20) Roseti, L.; Parisi, V.; Petretta, M.; Cavallo, C.; Desando, G.; Bartolotti, I.; Grigolo, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater. Sci. Eng. C*. 2017, 78, 1247–1259.
- (21) Suwandi, J. S.; Toes, R. E. M.; Nikolic, T.; Roep, B. O. Fabrication and in vitro characterization of three- dimensional organic/inorganic scaffolds by robocasting. *J. Biomed. Mater.* 2007, 33, 435–445.
- (22) Seeley, R. R.; Stephens, T. D.; Tate, P. *Anatomia e Fisiologia*, 6th ed.; Lusociência-Edições Técnicas e Científicas, Lda, 2003.
- (23) Stewart, G. J. The skeletal and muscular systems, 2004, Vol. 53, 144.
- (24) Gershkowitz, B. *Bone Mechanics Handbook*, 2nd Ed.; Cowin, C. S., ; 2001.
- (25) Fogelman, I.; Van Der Wall, H.; Gnanasegaran, G. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*; 2012; Vol. 3, 29–57.
- (26) Torres, P. Cimentos injetáveis à base de fosfatos de cálcio para vertebroplastia, Universidade de Aveiro, 2016.
- (27) Sadat-shojai, M.; Khorasani, M.; Dinpanah, E. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures. *Acta Biomaterialia*. 2013, 9 (8), 7591-7621.

- (28) Completo, A. F.; Fonseca, F. *Fundamentos da Biomecânica Músculo-Esquelética e Ortopédica*; Porto: Publindustria, 2011.
- (29) Barrère, F.; van Blitterswijk, C. A.; de Groot, K. Bone regeneration: Molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int. J. Nanomedicine*. 2006, 1 (3), 317–332.
- (30) Barinov, S. M. Calcium phosphate-based ceramic and composite materials for medicine. *Russ. Chem. Rev.* 2010, 79 (1), 13–29.
- (31) Isikli, C.; Hasirci, V.; Hasirci, N. Development of porous chitosan–gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds for hard tissue-engineering applications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012, 6 (2), 135–143.
- (32) Wagoner Johnson, A. J.; Herschler, B. A. 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.
- (33) Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I.; Alobera-Gracia, M. A.; del-Canto-Pingarrón, M.; Blanco-Jerez, L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med. oral, Patol. oral y cirugía bucal*. 2006, 11 (2), 151–157.
- (34) Oryan, A.; Alidadi, S.; Moshiri, A.; Maffulli, N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J. Orthop. Surg. Res.* 2014, 9 (1), 18.
- (35) Albrektsson, T.; Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* 2001, 10, 96–101.
- (36) Bone cancer-National cancer institute. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/bone/bone-fact-sheet>>. Acedido a 16 de Abril de 2018.
- (37) Santos, G.; Pinheiro, D. Aspectos da terapia etnofarmacológica associados à atividade antitumoral. Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 2014, 218–241.
- (38) Engel, E.; Gava, N. *Tumores Ósseos-Princípios de Diagnóstico e Tratamento*; 2012.
- (39) Brannon-peppas, L.; Blanchette, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004, 56, 1649–1659.
- (40) Laurencin, C.; Khan, Y.; El-Amin, S. F. Bone graft substitutes. *Expert Rev. Med. Devices* 2006, 3 (1), 49–57.
- (41) Silva, B. Fabrico de scaffolds porosos de vidro bioativo para regeneração óssea, Universidade de Aveiro, 2015.
- (42) Freitas, L. Scaffolds porosos à base de fosfatos de cálcio para regeneração óssea, Universidade de Aveiro, 2013.
- (43) Fontes, R. Fabrico e Caracterização de Scaffolds à Base de Fosfatos de Cálcio,

- Universidade Técnica de Lisboa, 2010.
- (44) Bose, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012, *30* (10), 546–554.
- (45) Jones, J. R. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2009, *29*, 1275–1281.
- (46) Babis, G. C.; Soucacos, P. N. Bone scaffolds: The role of mechanical stability and instrumentation. *Injury.* 2005, *36* (4), 38–44.
- (47) Ana, M. Grânulos porosos para regeneração óssea e libertação controlada de fármacos, Universidade de Aveiro, 2010.
- (48) Giannoudis, P. V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. Bone substitutes: An update. *Injury* 2005, *36* (3), 20–27.
- (49) Lobo, S. E.; Arinzeh, T. L. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone regeneration and tissue engineering applications. *Materials (Basel).* 2010, *3*, 815–826.
- (50) Sulaiman, S. Bin; Keong, T. K.; Cheng, C. H.; Saim, A. Bin; Hj Idrus, R. B. Tricalcium phosphate/hydroxyapatite (TCP-HA) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineered bone. *Indian J. Med. Res.* 2013, *137* (6), 1093–1101.
- (51) Gauthier, O.; Bouler, J. M.; Aguado, E.; Pilet, P.; Daculsi, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998, *19*, 133–139.
- (52) Chang, B. S.; Lee, C. K.; Hong, K. S.; Youn, H. J.; Ryu, H. S.; Chung, S. S.; Park, K. W. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 2000, *21* (12), 1291–1298.
- (53) Driessens, F.; Verbeeck, R. Relation between Physico-Chemical Solubility and Biodegradability of Calcium Phosphates. *implant Mater. biofunction. Adv. Biomater.* 1988, 105–111.
- (54) Refojo, M. F. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Academic P.; 1996.
- (55) Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomatter* 2011, *1* (2), 121–164.
- (56) Isabel, C.; Sánchez, P. Desarrollo y caracterización de andamiajes De Fosfato Cálcico Bifásico (Bcp) Para Ingeniería De Tejido Óseo Mediante Moldeo, Universidad de Extremadura, 2015.
- (57) Costa, A. C. F. M.; Lima, M. G.; Lima, L. H. M. A.; Cordeiro, V. V; Viana, K. M. S. Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos.* 2009, 29–38.

- (58) Petrov, O. E.; Dyulgerova, E.; Petrov, L.; Popova, R. Characterization of calcium phosphate phases obtained during the preparation of sintered biphasic Ca-P ceramics. *Mater. Lett.* 2001, *48*, 162–167.
- (59) Kivrak, N.; Tas, A. C. Synthesis of Calcium Hydroxyapatite–Tricalcium Phosphate (HA–TCP) Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior. *J. Am. Ceram. Soc.* 1998, *81* (9), 2245–2252.
- (60) Pina, S. C. D. A. Cimentos de fosfato de cálcio dopados para implantologia óssea, Universidade de Aveiro, 2009.
- (61) Laskus, A.; Kolmas, J. Ionic substitutions in non-apatitic calcium phosphates. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, *18*, 1–22.
- (62) Schumacher, M.; Gelinsky, M. Strontium modified calcium phosphate cements - Approaches towards targeted stimulation of bone turnover. *J. Mater. Chem. B.* 2015, *3*, 4626–4640.
- (63) Kannan, S.; Vieira, S. I.; Olhero, S. M.; Torres, P. M. C.; Pina, S.; Da Cruz E Silva, O. A. B.; Ferreira, J. M. F. Synthesis, mechanical and biological characterization of ionic doped carbonated hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate mixtures. *Acta Biomater.* 2011, *7*, 1835–1843.
- (64) 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.
- (65) Kannan, S.; Pina, S.; Ferreira, J. M. F. Formation of strontium-stabilized β -tricalcium phosphate from calcium-deficient apatite. *J. Am. Ceram. Soc.* 2006, *89* (10), 3277–3280.
- (66) 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.
- (67) Kannan, S.; Goetz-Neunhoffer, F.; Neubauer, J.; Pina, S.; Torres, P. M. C.; Ferreira, J. M. F. Synthesis and structural characterization of strontium- and magnesium-co-substituted β -tricalcium phosphate. *Acta Biomater.* 2010, *6*, 571–576.
- (68) Kishore, R.; Srivastava, M.; Prasad, N. K.; Awasthi, S.; Dhayalan, A.; Kannan, S. Iron doped β -Tricalcium phosphate: Synthesis, characterization, hyperthermia effect, biocompatibility and mechanical evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* 2017, *78*, 715–726.
- (69) Gomes, S.; Kaur, A.; Grenèche, J. M.; Nedelec, J. M.; Renaudin, G. Atomic scale modeling of iron-doped biphasic calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc. 2017, 78–88.
- (70) Lieu, P. T.; Heiskala, M.; Peterson, P. A.; Yang, Y. The roles of iron in health and

- disease. *Mol. Aspects Med.* 2001, 22 (1–2), 1–87.
- (71) Glenske, K.; Donkiewicz, P.; Köwitsch, A.; Milosevic-Oljaca, N.; Rider, P.; Rofall, S.; Franke, J.; Jung, O.; Smeets, R.; Schnettler, R.; et al. Applications of Metals for Bone Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19 (3), 2–32.
- (72) Abbaspour, Nazanin, Richard Hurrell, R. K. Review on iron and its importance for human health. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* 2014, 19 (2), 164.
- (73) Li, Y.; Widodo, J.; Lim, S.; Ooi, C. P. Synthesis and cytocompatibility of manganese (II) and iron (III) substituted hydroxyapatite nanoparticles. *J. Mater. Sci.* 2012, 47, 754–763.
- (74) Kanczler, J. M.; Sura, H. S.; Magnay, J.; Green, D.; Oreffo, R. O. C.; Dobson, J. P.; El Haj, A. J. Controlled Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells Using Magnetic Nanoparticle Technology. *Tissue Eng. Part A* 2010, 16 (10), 3241–3250.
- (75) Renaudin, G.; Gomes, S.; Nedelec, J. M. First-row transition metal doping in calcium phosphate bioceramics: A detailed crystallographic study. *Materials (Basel)*. 2017, 10, 1–22.
- (76) Mercado, D. F.; Magnacca, G.; Malandrino, M.; Rubert, A.; Montoneri, E.; Celi, L.; Bianco Prevot, A.; Gonzalez, M. C. Paramagnetic iron-doped hydroxyapatite nanoparticles with improved metal sorption properties. A bioorganic substrates-mediated synthesis. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014, 6, 3937–3946.
- (77) Ito, M.; Hidaka, Y.; Nakajima, M.; Yagasaki, H.; Kafrawy, A. H. Effect of hydroxyapatite content on physical properties and connective tissue reactions to a chitosan-hydroxyapatite composite membrane. *J. Biomed. Mater. Res. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater.* 1999, 45 (3), 204–208.
- (78) Zhang, Y.; Zhang, M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.* 2001, 55 (3), 304–312.
- (79) Finisie, M. R.; Josué, A.; Fávere, V. T.; Laranjeira, M. C. M. Synthesis of calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2001, 73, 525–532.
- (80) Szymańska, E.; Winnicka, K. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar. Drugs* 2015, 13, 1819–1846.
- (81) Muzzarelli, R. A. A.; El Mehtedi, M.; Bottegoni, C.; Aquili, A.; Gigante, A. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. *Mar. Drugs* 2015, 13, 7314–7338.
- (82) Bianchi, M.; Causi, S.; Marcacci, M.; Russo, A. Biomimetic Approaches for Tissue Healing. *Biomim. Approaches Tissue Heal.* 2015.
- (83) Zhang, Y.; Zhai, D.; Xu, M.; Yao, Q.; Chang, J.; Wu, C. 3D-printed bioceramic

- scaffolds with a Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite interface for hyperthermia therapy of bone tumor cells. *J. Mater. Chem. B* 2016, 4, 2874–2886.
- (84) Santis, R.; Gloria, A.; Russp, T.; D'Amora, U.; Zeppetelli, S.; Dionigi, C.; Sytcheva, A.; Hermannsdorfer, T.; Dediu, V.; Ambrosio, L. A Basic Approach Toward the Development of Nanocomposite Magnetic Scaffolds for Advanced Bone Tissue Engineering. *J. Appl. Polym. Sci.* 2011, 122, 3599–3605.
- (85) Zeng, X. B.; Hu, H.; Xie, L. Q.; Lan, F.; Jiang, W.; Wu, Y.; Gu, Z. W. Magnetic responsive hydroxyapatite composite scaffolds construction for bone defect repairment. *Int. J. Nanomedicine* 2012, 7, 3365–3378.
- (86) Andronescu, E.; Fikai, M.; Voicu, G.; Fikai, D.; Maganu, M.; Fikai, A. Synthesis and characterization of collagen/hydroxyapatite: Magnetite composite material for bone cancer treatment. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010, 21, 2237–2242.
- (87) Hedayatnasab, Z.; Abnisa, F.; Daud, W. M. A. W. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater. Des.* 2017, 123, 174–196.
- (88) Ivan, F. D.; Avîrvarei, I. G.; Vasila, I. G.; Vera, B.; Butnaru, M. Porous Magnetic Scaffolds For Bone Tissue Engineering and Regeneration. In *E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*; IEEE, 2017; 713–716.
- (89) Beherei, H. H.; Abdel-Aal, M. S.; Shaltout, A. A.; El-Magharby, A. Bio-physiochemical characterization of anticancer nano-ceramic polymer scaffold for bone grafting. *Der Pharma Chem.* 2012, 4 (1), 544–551.
- (90) Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011, 63, 24–46.
- (91) Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fähling, H.; Felix, R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 1999, 201, 413–419.
- (92) Zhao, D.; Zeng, X.; Xia, Q.; Tang, J. Inductive heat property of Fe₃O₄ nanoparticles in AC magnetic field for local hyperthermia. *Rare Met.* 2006, 25, 621–625.
- (93) Bock, N.; Riminucci, A.; Dionigi, C.; Russo, A.; Tampieri, A.; Landi, E.; Goranov, V. A.; Marcacci, M.; Dediu, V. A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds. *Acta Biomater.* 2010, 6, 786–796.
- (94) Wu, Y.; Jiang, W.; Wen, X.; He, B.; Zeng, X.; Wang, G.; Gu, Z. A novel calcium phosphate ceramic-magnetic nanoparticle composite as a potential bone substitute. *Biomed. Mater.* 2010, 5 (1), 1–7.
- (95) Wu, C.; Fan, W.; Zhu, Y.; Gelinsky, M.; Chang, J.; Cuniberti, G.; Albrecht, V.; Friis, T.; Xiao, Y. Multifunctional magnetic mesoporous bioactive glass scaffolds

- with a hierarchical pore structure. *Acta Biomater.* 2011, 7, 3563–3572.
- (96) Fical, A.; MARQUES, C.; FERREIRA, J. M. F.; Andronescu, E.; FICAL, D.; Sonmez, M. Multifunctional materials for bone cancer treatment. *Int. J. Nanomedicine* 2014, 9, 2713–2725.
- (97) Kobayashi, T. Cancer hyperthermia using nanomagnetic particles and induction of immune responses. In *Handbook of Nanobiomedical Research: Fundamentals, Applications and Recent Developments*; 2014; 465–499.
- (98) Barry, S. E. Challenges in the development of magnetic particles for therapeutic applications. *Int. J. Hyperth.* 2008, 24 (6), 451–466.
- (99) Pinheiro, M. As nanoesferas de carragenana como potencial veículo de fármacos, Universidade de Aveiro, 2012.
- (100) Ribeiro, S. Encapsulação e Libertação Controlada de Fármacos, Escola Superior de Tecnologia e Gestão- Instituto Politécnico de Bragança, 2014.
- (101) dos Santos, M. V. B.; Osajima, J. A.; da Silva Filho, E. C. Hidroxiapatita : suporte para liberação de fármacos e propriedades antimicrobianas (Hydroxyapatite : support for drug release and antimicrobial properties). *Cerâmica* 2016, 62, 256–265.
- (102) Ribeiro, E. Cinética da libertação de fármacos a partir de matrizes sólidas, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, 2011.
- (103) Martins, M. I. P. Desenvolvimento de hidrogéis à base de quitosano/fosfatos de cálcio para aplicações ortopédicas, Faculdade de ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- (104) Nanda, H. S. Preparation of Porous Scaffolds with Controlled Drug Release for Tissue Engineering, University of Tsukuba, 2015.
- (105) Maia, M. Desenvolvimento de sistemas multicamada para libertação controlada de fármacos anticancerígenos., Universidade de Aveiro, 2017.
- (106) Ornellas, N.; Rodrigues, L. Estudo da libertação controlada de fármacos por hidrogéis De Pva/Atapulgita, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- (107) Juste Díez de Pinos, J. L.; Adrover Rigó, M.; Ribas Sala, J. Levofloxacin, fluorquinolona de tercera generación. *Farmacia Hospitalaria.* 2000, pp 288–295.
- (108) Silva, S. Novel antibiotic-loaded orthopaedic bone cements: insights on drug release profiles and biocompatibility, Faculdade de Farmácia da Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- (109) Matos, A. Investigation of New Formulations of Acrylic Bone Cement Containing Antibiotics, Faculdade de Farmácia da Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- (110) Abdelaal, O. A.; Darwish, S. M. Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds Using Rapid Prototyping Techniques. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 2011, 5 (11), 2317–

- 2325.
- (111) Moreno, M. S. M. da S. Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo, Universidade Fernando Pessoa, 2014.
- (112) Jung, Y.; Kim, S. H.; Kim, S. H.; Kim, S. H. New fabrication methods of bioactive and biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *J. Cell. Plast.* 2011, 47 (3), 261–270.
- (113) Studart, A. R.; Gonzenbach, U. T.; Tervoort, E.; Gauckler, L. J. Processing routes to macroporous ceramics: A review. *J. Am. Ceram. Soc.* 2006, 89 (6), 1771–1789.
- (114) Nimit Patel, G. R. and C. R. (2012); Sap, K. A.; Demmers, J. A. A.; Yücel, S.; Terzioğlu, P.; Özçimen, D. Biofabrication of Tissue Scaffolds. In *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*; 2013; 315–328.
- (115) Nimit Patel, G. R. and C. R. (2012); Sap, K. A.; Demmers, J. A. A.; Yücel, S.; Terzioğlu, P.; Özçimen, D. Porous Ceramics. In *Advanced Ceramic Processing*; 2015; 6, 55–83.
- (116) Hutmacher, D. W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2001, 12 (1), 107–124.
- (117) Rodrigues, V.; Zancul, E.; Mançanares, C.; Giordano, C.; Salerno, M. Manufatura aditiva : estado da arte e framework de aplicações. *Revista GEPROS.* 2017, 1–34.
- (118) Guo, N.; Leu, M. C. Additive manufacturing: Technology, applications and research needs. *Front. Mech. Eng.* 2013, 8 (3), 215–243.
- (119) Miranda, P.; Pajares, A.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Guiberteau, F. Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 2008, 85 (1), 218–227.
- (120) Suwandi, J. S.; Toes, R. E. M.; Nikolic, T.; Roep, B. O. Robotic deposition of model hydroxyapatite scaffolds with multiple architectures and multiscale porosity for bone tissue engineering. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2007, 82 (2), 383–394.
- (121) Munch, E.; Franco, J.; Deville, S.; Hunger, P.; Saiz, E.; Tomsia, A. P. Porous ceramic scaffolds with complex architectures. *Jom.* 2008, 60 (6), 54–59.
- (122) Manuscript, A.; Hydrogel, W. Direct-Write Assembly of Calcium Phosphate Scaffolds Using a Water-Based Hydrogel. *Acta Biomater.* 2010, 6 (1), 218–228.
- (123) Miranda, P.; Saiz, E.; Gryn, K.; Tomsia, A. P. Sintering and robocasting of β -tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications. *Acta Biomater.* 2006, 2, 457–466.
- (124) Marques, C. F.; Perera, F. H.; Marote, A.; Ferreira, S.; Vieira, S. I.; Olhero, S.; Miranda, P.; Ferreira, J. M. F. Biphasic calcium phosphate scaffolds fabricated by direct write assembly: Mechanical, anti-microbial and osteoblastic properties. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2016, 37 (1), 359–368.

- (125) Sa, M. W.; Kim, J. Y. Fabrication and evaluation of 3D β -TCP scaffold by novel direct-write assembly method. *Journal of Mechanical Science and Technology*. 2015, 5369–5376.
- (126) Houmard, M.; Fu, Q.; Genet, M.; Saiz, E.; Tomsia, A. P. On the structural, mechanical, and biodegradation properties of HA/ β -TCP robocast scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 2013, 101 (7), 1233–1242.
- (127) Martínez-Vázquez, F. J.; Cabañas, M. V.; Paris, J. L.; Lozano, D.; Vallet-Regí, M. Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration. *Acta Biomater.* 2015, 15, 200–209.
- (128) Marques, C. F.; Olhero, S. M.; Torres, P. M. C.; Abrantes, J. C. C.; Fateixa, S.; Nogueira, H. I. S.; Ribeiro, I. A. C.; Bettencourt, A.; Sousa, A.; Granja, P. L.; et al. Novel sintering-free scaffolds obtained by additive manufacturing for concurrent bone regeneration and drug delivery: Proof of concept. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 94, 426–436.
- (129) Singh, R. k.; Srivastava, M.; Prasad, N. K.; Awasthi, S.; Dhayalan, A.; Kannan, S. Iron doped β -Tricalcium phosphate: Synthesis, characterization, hyperthermia effect, biocompatibility and mechanical evaluation. *Materials Science and Engineering C*. Elsevier B.V. 2017, 715–726.
- (130) Destainville, A.; Champion, E.; Laborde, E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. *Materials Chemistry and Physics*. 2003, 269–277.
- (131) Canham, G.; Overton, T. *Descriptive Inorganic Chemistry*, 5th Ed.; 2010.
- (132) Silva, P. de A. S. da; Dupim, M. dos S.; Chazin, E. de L. Acetic Acid (CAS 64-19-7). *Revista Virtual de Química*. 2015, 2647–2662.
- (133) Aplicações do ácido cítrico na indústria de alimentos. *Food Ingredients Brasil*. 2014, 96–103.
- (134) Nicolet, T.; All, C. *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*, 2001.
- (135) Hamer, F.; Hamer, J. *The Potter's Dictionary of Materials and Techniques*, 5th Ed; 2004.
- (136) Lazoryak, B. I.; Morozov, V. A.; Belik, A. A.; Khasanov, S. S.; Sh Shekhtman, V. Crystal Structures and Characterization of $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ and $\text{Ca}_9\text{FeH}_{0.9}(\text{PO}_4)_7$. *J. Solid State Chem.* 1996, 122, 15–21.
- (137) Chandra, V. S.; Baskar, G.; Suganthi, R. V; Elayaraja, K.; Joshy, M. I. A.; Beaula, W. S.; Mythili, R.; Venkatraman, G.; Kalkura, S. N. Blood Compatibility of Iron-Doped Nanosize Hydroxyapatite and Its Drug Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2012, 4, 1200–1210.
- (138) Marques, C. F.; Olhero, S.; Abrantes, J. C. C.; Marote, A.; Ferreira, S.; Vieira, S. I.; Ferreira, J. M. F. Biocompatibility and antimicrobial activity of biphasic calcium

- phosphate powders doped with metal ions for regenerative medicine. *Ceram. Int.* 2017, *43*, 15719–15728.
- (139) Kaygili, O.; Dorozhkin, S. V.; Ates, T.; Al-Ghamdi, A. A.; Yakuphanoglu, F. Dielectric properties of Fe doped hydroxyapatite prepared by sol-gel method. *Ceram. Int.* 2014, *40*, 1–8.
- (140) Low, H. R.; Phonthammachai, N.; Maignan, A.; Stewart, G. A.; Bastow, T. J.; Ma, L. L.; White, T. J. The crystal chemistry of ferric oxyhydroxyapatite. *Inorg. Chem.* 2008, *47*, 11774–11782.
- (141) Kyriacou, A.; Leventouri, T.; Chakoumakos, B. C.; Garlea, V. O.; Dela Cruz, C. B.; Rondinone, A. J.; Sorge, K. D. Combined X-ray and neutron diffraction Rietveld refinement in iron-substituted nano-hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.* 2013, *48*, 3535–3545.
- (142) Pai, M. P.; Allen, S. E.; Amsden, G. W. Altered steady state pharmacokinetics of levofloxacin in adult cystic fibrosis patients receiving calcium carbonate. *J. Cyst. Fibros.* 2006, *5*, 153–157.
- (143) Zocca, A.; Colombo, P.; Gomes, C. M.; Günster, J. Additive Manufacturing of Ceramics: Issues, Potentialities, and Opportunities. *J. Am. Ceram. Soc.* 2015, *98* (7), 1983–2001.
- (144) Jian, Z.; Liu, Q.; Dekkers, M.; Colombo, C.; Yu, Y.; Barrón, V.; Torrent, J. Ferro and antiferromagnetism of ultrafine-grained hematite. *Geochemistry, Geophys. Geosystems.* 2014, *15* (6), 2699–2712.
- (145) Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S.; Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2003, *36* (3), 167–181.
- (146) Goya, G. F.; Berquó, T. S.; Fonseca, F. C.; Morales, M. P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J. Appl. Phys.* 2003, *94*, 3520–3528.
- (147) Gloria, A.; Russo, T.; D'amora, U.; Zeppetelli, S.; D'Alessandro, T.; Sandri, M.; Bañobre-López, M.; Piñeiro-Redondo, Y.; Uhlarz, M.; Tampieri, A.; et al. Magnetic poly(ϵ -caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposite substrates for advanced bone tissue engineering. *J. R. Soc. Interface.* 2013, *10* (80), 1–11.