



**Tânia Sofia Santos  
Carvalho**

**Cimentos ósseos multifuncionais injetáveis**



**Tânia Sofia Santos  
Carvalho**

## **Cimentos ósseos multifuncionais injetáveis**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana Maria Henriques Olhero, investigadora auxiliar do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica, Doutora Paula Maria da Costa Torres, investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica e da Doutora Sandra Isabel Pinto Vieira, Professora auxiliar convidada do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a fazer sempre mais e melhor.

## **o júri**

presidente

**Professor Doutor. Rui Ramos Ferreira e Silva**  
Professor Associado da Universidade de Aveiro

**Professor Doutor Manuel Almeida Valente**  
Professor Associado da Universidade de Aveiro

**Doutora Susana Maria Henriques Olhero**  
Investigadora Auxiliar da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

“Se quiseres chegar rápido, vai sozinho. Se quiseres chegar longe, vai acompanhado.” Uma jornada um tanto ou quanto longa que, sem a paciência, a companhia, a amizade, o carinho e a sabedoria dos que sempre me rodearam, não seria possível de alcançar com tanta alegria e sentimento de conquista.

Um grande obrigada às minhas orientadoras, Doutora Susana Maria Henriques Olhero, Doutora Paula Maria da Costa Torres e Doutora Sandra Isabel Pinto Vieira. Sem a orientação delas, não teria sido possível realizar este trabalho. Por toda a sua ajuda, tempo disponibilizado, momentos de trabalho e também de risadas. A vocês, o meu maior obrigada com muito carinho.

Obrigada aos técnicos do DEMAC, por toda a paciência e trabalho. Um obrigada especial ao Dr. João Horta do DFis, que se mostrou sempre disponível para ajudar de sorriso no rosto, ao Dr. João Amaral e ao Professor Vítor Amaral pelo conhecimento transmitido e ao Dr. João Abrantes do IPVC, pela sua contribuição nas análises de DRX por refinamento de Rietveld.

Ao Centro Hospitalar Baixo Vouga, em especial à equipa envolvida na esterilização das amostras. Muito obrigada às enfermeiras Áurea Simões e Margarida Vilarinho.

À minha companhia no laboratório - Andreia “Andreioca Pêra” Pereira, Filipa “Pipas” Rodrigues e Manuel “Nelito” Barros. Por todos os almoços a desabafar sobre o trabalho, por todos os risos, pelos momentos de stress também. Acompanharam-me nesta jornada e tornaram-na mais colorida e feliz. Agradeço-vos com todo o meu coração.

Um obrigada a todos os meus amigos que fizeram este percurso comigo, àqueles que me acompanham desde o início da minha vida académica, mas também aos que chegaram a meio dela. Em especial quero agradecer à Bárbara Sousa, que além de ser uma grande amiga, contribuiu bastante para a realização deste projeto. Obrigada por todas as tuas horas, de amizade e de trabalho.

A todos os meus familiares que de alguma forma mostram o seu apoio e carinho. “Aveiro, o que tu juntas simplesmente ninguém separa.” Um obrigada muito especial e cheio de carinho ao Ricardo Carvalho. Por todas as tuas horas de muita paciência para me aturar, pela companhia e carinho, por todos os momentos partilhados... “Nunca serás memória, porque um pedaço do meu coração já é teu.”

Aos meus pais, por sempre acreditarem que eu era capaz e que nada me faria parar. Por todos os sacrifícios que fizeram, amor, chamadas de atenção, mas também por me transmitirem calma quando mais precisei. Vocês fizeram de mim a mulher que sou hoje e, todo o amor que dediquei a este meu “bebé” se deve a tudo o que me ensinaram. A fazer o que gosto com paixão, sem desistir, mesmo quando os momentos difíceis parecem querer vencer. A vocês, OBRIGADA!

## palavras-chave

Fosfatos de cálcio, ferro, magnetismo, proliferação osteoblástica, cimentos ósseos.

## resumo

O objetivo desta dissertação consistiu na obtenção de um cimento ósseo multifuncional injetável, com propriedades magnetotérmicas e elevada capacidade regenerativa.

Na primeira parte do trabalho, foram sintetizados pós de fosfatos de cálcio não dopados e dopados com diferentes teores de íons Fe (0-10 mol.%) por precipitação química em meio aquoso. Foi estudada a influência do teor de ferro, do estado de oxidação do íon precursor ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) e da temperatura do tratamento térmico (1000-1100°C) na estrutura, morfologia e propriedades biológicas e magnéticas dos pós de  $\beta$ -fosfato tricálcico dopados. A incorporação do Fe na estrutura cristalina foi provada por Difração de Raios-X complementada com refinamento de Rietveld e FT-IR. A presença do íon Fe deu lugar ao aparecimento de uma nova fase,  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ , para teores de Ferro  $\geq 7$ -mol%. O aumento da concentração de ferro originou a diminuição dos parâmetros de rede  $a$  e  $c$  e afetou a morfologia dos pós. Os pós dopados mostraram ter um comportamento aparentemente antiferromagnético, aumentando a magnetização a 40 000 Oe com o aumento do teor de Ferro e com o  $\text{Fe}^{2+}$  como íon precursor em relação ao  $\text{Fe}^{3+}$ .

Os cimentos de fosfato de cálcio foram preparados através da mistura de pós TCP dopados com 0, 3 e 7% molar de ferro calcinados a 1100°C (TCP0Fe-1100, TCP3Fe<sup>2+</sup>-1100 e TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100) e fosfato monocálcico monohidratado (MCPM) com uma solução aquosa 5 wt.% de ácido cítrico. As pastas cimentícias foram caracterizadas quanto aos tempos de presa e injetabilidade. Os cimentos endurecidos foram avaliados por resistência à compressão, porosidades e fases cristalinas formadas. A presença da fase  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  dificultou a reação de presa para os cimentos com 7 mol.% Fe, que apresentaram tempos de presa demasiado longos, inviáveis para cimentos injetáveis. A adição de 15 wt.% de um outro pó (HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100) também dopado com 7 mol% de ferro, contendo na composição das fases cristalinas maior percentagem de fase  $\beta$ -TCP em vez de  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ , permitiu a diminuição dos longos tempos de presa deste cimento. Todas as pastas cimentícias testadas apresentaram bom desempenho na injetabilidade, sendo visível alguma falta de coesão na pasta, que afetou as propriedades de resistência à compressão a húmido dos cimentos endurecidos. O cimento obtido apresentou um comportamento magnético semelhante aos pós precursores. A adição de nanopartículas de magnetite (NPs) ao cimento obtido com pós dopados melhorou a sua magnetização, que foi superior quando comparada com um cimento obtido com pós puros na presença da mesma quantidade de NPs, mostrando a vantagem da presença do ferro nos pós dopados. Contudo, os pós precursores do cimento sem a presença de nanopartículas não apresentaram resposta magnetotérmica, não atingindo a temperatura desejada (39-46°C) para tratamento hipertérmico.

**keywords**

Calcium phosphates, iron, magnetism, osteoblastic proliferation, bone cements, properties of CPCs.

**abstract**

The main objective of this work was the development of an injectable and multifunctional bone cement, with the ability to stimulate osteoblastic differentiation, as well as an improvement of its injectability and compressive strength properties.

On the first part of this work, calcium phosphate powders undoped and doped with iron were synthesized with different molar concentrations of iron ions (0-10 mol.%) by aqueous precipitation method. The influence of the iron molar concentration, the valence of iron ion precursor ( $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ ) and the thermal treatment temperature (1000-1100°C) on the structure, morphology, biological and magnetic properties of the iron doped  $\beta$ -tricalcium phosphate powders was studied. The incorporation of Fe on the crystal structure was proved by X-ray Diffraction and complemented with Rietveld's refinement and IR-FT. A new phase,  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ , appeared with the presence of iron for concentrations above 7 mol.%. The increase of iron concentration lead to a decrease on *a* and *c* lattice parameters and affected the powders' morphology. The doped powders showed an apparently antiferromagnetic behavior, increasing the magnetization at 40 000 Oe as the iron content increases and with  $\text{Fe}^{2+}$  as precursor ion in relation to  $\text{Fe}^{3+}$ .

Calcium phosphate bone cements were prepared by mixing TCP-Fe powders doped with 0, 3 and 7 mol.% of iron, heat treated at 1100°C (TCP0Fe-1100, TCP3Fe<sup>2+</sup>-1100 e TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100) and monocalcium phosphate monohydrated (MCPM) with a 5 wt.% of citric acid solution, as setting liquid. The cement pastes were characterized by setting time and injectability. The hardened cements were evaluated by compressive strength, total porosity and crystal phases. The presence of  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  hampered the setting reaction for the cements with 7 mol.% Fe, which showed long setting times, undermining to injectable bone cements. Adding 15 wt.% of another powder (HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100), also doped with 7 mol.% of iron and containing  $\beta$ -TCP as main crystal phase instead of  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ , allowed the decreasing of long setting times of this cement. All of the tested cement pastes showed good injectability performance, although a certain lack of cohesion of the paste was observed, reflecting on compressive strength properties of the hardened cements immersed on PBS solution. The obtained cement showed a magnetic behavior similar to the precursor powders. Adding magnetite nanoparticles (NPs) to the cement obtained with doped powders improved its magnetization, which was superior when compared to a cement obtained with pure powders in the presence of the same amount of NPs, showing the advantage of iron in the powders. However, cement precursor powders without nanoparticles showed no magnetothermic response, not reaching the desired temperature (39-46°C) for hyperthermia treatment.





# Índice

<b>Enquadramento teórico e objetivos</b> .....	1
<b>Capítulo 1 – Estado da Arte</b> .....	5
1.1. Tecido ósseo.....	7
1.1.1. Macro e microestrutura do osso .....	7
1.1.2. Osteogénese .....	11
1.1.3. Remodelação óssea.....	13
1.1.4. Sarcomas ósseos .....	14
1.2. Biomateriais como substitutos ósseos.....	18
1.2.1. Substitutos ósseos à base de fosfatos de cálcio.....	19
1.2.2. Substituição iónica em fosfatos de cálcio .....	23
1.3. Cimentos ósseos à base de fosfatos de cálcio.....	24
1.3.1. Propriedades dos CPCs .....	26
1.4. Aplicações biomédicas .....	31
1.5. Hipertermia e materiais já utilizados para esta aplicação.....	31
1.5.1. Nanopartículas magnéticas (MNPs) .....	33
1.5.2. Scaffolds magnéticos.....	34
<b>Capítulo 2 - Obtenção e caracterização de pós de fosfatos de cálcio não dopados e dopados com ferro</b> .....	35
2.1. Enquadramento teórico .....	37
2.2. Procedimento experimental .....	38
2.2.1. Preparação de pós de fosfatos de cálcio não dopados e dopados com ferro.....	38
2.2.2. Caracterização de pós de fosfatos de cálcio não dopados e dopados com ferro.....	40
2.3. Resultados e discussão .....	45

2.3.1. Caracterização estrutural e morfológica dos pós de $\beta$ -TCP dopados com ferro.....	45
2.3.1.1. Efeito do aumento do teor de ferro.....	45
2.3.1.2. Efeito do estado de oxidação do ião ferro precursor.....	53
2.3.1.3. Efeito da temperatura de calcinação.....	59
2.3.2. Caracterização magnética dos pós de $\beta$ -TCP dopados com ferro....	65
2.3.3. Avaliação biológica dos pós $\beta$ -TCP dopados com ferro.....	67
2.4. Conclusões.....	70
<b>Capítulo 3 – Obtenção e caracterização de cimentos injetáveis.....</b>	<b>71</b>
3.1. Enquadramento teórico.....	73
3.2. Procedimento experimental.....	74
3.2.1. Preparação das pastas cimentícias.....	74
3.2.2. Caracterização das pastas cimentícias.....	77
3.2.3. Caracterização dos cimentos endurecidos.....	79
3.3. Resultados e discussão.....	83
3.4. Conclusões.....	96
<b>Capítulo 4 – Considerações finais, limitações e trabalho futuro.....</b>	<b>99</b>
4.1. Considerações gerais.....	101
<b>Referências.....</b>	<b>103</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>111</b>
Anexo 1.....	113

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Classificação dos ossos segundo a sua forma: longo, curto, plano e irregular (adaptado).....	7
<b>Figura 2</b> - Ilustração de um osso longo – fémur – onde são mostrados os componentes principais do mesmo como a diáfise e a epífise, bem como as linhas da epífise (a) e os componentes internos da diáfise (b). É mostrado que a epífise tem uma maior quantidade de osso esponjoso do que compacto e vice-versa na diáfise (adaptado).....	8
<b>Figura 3</b> - Osso compacto ou cortical e osso trabecular ou esponjoso. O osso compacto mostra-se mais denso e organizado, enquanto o esponjoso é altamente poroso favorecendo a presença de medula óssea nesses espaços, assim como vasos sanguíneos (adaptado).....	9
<b>Figura 4</b> - Formação das células ósseas – osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As células osteogénicas dão origem aos osteoblastos, que se desenvolvem em osteócitos. Os osteoclastos são provenientes de células estaminais (adaptado).. .....	11
<b>Figura 5</b> - Etapas da ossificação endocondrial; (A e B) Diferenciação de células mesenquimais para condrócitos e formação do modelo de cartilagem para o osso futuro. (C) Aumento de volume dos condrócitos e apoptose celular, enquanto a matriz extracelular é mudada e mineralizada. Favorecimento da entrada de vasos sanguíneos. (D e E) Entrada de osteoblastos pelos vasos sanguíneos, degeneração da matriz cartilaginosa e depósito de matriz óssea. (F-H) Formação óssea e crescimento do osso (adaptado). ....	12
<b>Figura 6</b> - Etapas da reparação óssea entre as quais, a remodelação se encontra no final por forma a completar o processo (adaptado).....	13
<b>Figura 7</b> - Osteossarcoma numa criança. A imagem mostra o triângulo de Codman - uma matriz subtil de tecido mole com uma reação periosteal anormal formando uma densidade triangular que se estende muito próximo das estruturas neurovasculares (seta).....	15

<b>Figura 8</b> - Solubilidade do (a) Ca e do (b) P para os diferentes valores de pH nos diferentes compostos de CaP (HAP – Hidroxiapatite) .....	21
<b>Figura 9</b> - Modificação de estrutura cristalográfica do $\beta$ -TCP para $\alpha$ -TCP com o aumento da temperatura em que a) é estrutura romboédrica e b) estrutura monoclinica. ....	22
<b>Figura 10</b> - Diagrama dos parâmetros de presa relevantes para um CPC: TC - tempo de coesão; I - tempo de presa inicial (IST); F - tempo de presa final (FST) (adaptado). ....	27
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática do sistema de avaliação da injetabilidade dos CPCs (adaptado). ....	28
<b>Figura 12</b> - Representação esquemática das amostras para os ensaios mecânicos de compressão (adaptado). ....	30
<b>Figura 13</b> - Esquema do tratamento por hipertermia; O biomaterial magnético é colocado no local do tecido tumoral por um sistema de entrega de fármaco (DDS), seguindo-se de uma irradiação com um campo magnético alternado (AMF) produzido no exterior do corpo, resultando numa hipertermia intracelular específica (adaptado). ....	32
<b>Figura 14</b> - Esquema do procedimento para a preparação de amostras para as medidas de magnetização. ....	42
<b>Figura 15</b> - (a) Difratomogramas dos pós de fosfatos de cálcio dopados com diferentes concentrações de ferro, com o ião precursor $Fe^{2+}$ , calcinados a $1000^{\circ}C$ e as respetivas fichas PDF utilizadas para a identificação das fases presentes: 04-006-9376 ( $\beta$ -TCP), 04-009-3876 (CPP), 04-008-4393 [ $Ca_9Fe(PO_4)_7$ ] e 04-007-9266 ( $\alpha$ - $Fe_2O_3$ ); (b) ampliação do difratograma (a) entre $2\theta = 25$ e $30^{\circ}$ e (c) ampliação do difratograma (a) entre $2\theta = 30$ e $35^{\circ}$ . ....	46
<b>Figura 16</b> - Influência da concentração de Fe nos parâmetros de rede a e c na estrutura do $\beta$ -TCP. Parâmetros de rede medidos para $TCP_0Fe$ : $a = 10,4180 \text{ \AA}$ ; $c = 37,3979 \text{ \AA}$ ; e para $TCP_{10}Fe^{2+}$ : $a = 10,3467 \text{ \AA}$ ; $c = 37, 2101 \text{ \AA}$ . ....	47

<b>Figura 17</b> - Espectro FT-IR dos pós de TCP-Fe dopados com diferentes concentrações de ferro, calcinados a 1000°C.....	48
<b>Figura 18</b> - Fotografias dos pós TCP-Fe calcinados a 1000°C e peneirados a 40 $\mu\text{m}$ : A - TCP0Fe, B - TCP3Fe <sup>2+</sup> , C - TCP7Fe <sup>2+</sup> e D - TCP10Fe <sup>2+</sup> .....	49
<b>Figura 19</b> - Distribuição do tamanho de partícula nos pós TCP-Fe com diferentes concentrações de Fe <sup>2+</sup> calcinados a 1000°C e peneirados a 40 $\mu\text{m}$ . .....	50
<b>Figura 20</b> - Micrografias obtidas por SEM dos pós com as diferentes concentrações molares de Fe com as ampliações a) 1K; b) 10K; e respetivo mapeamento da superfície (c).....	52
<b>Figura 21</b> – (a) Difratogramas dos pós de fosfatos de cálcio dopados com duas concentrações de íão ferro (7 e 10 mol.%), usando como precursores iniciais dois estados de oxidação diferentes Fe <sup>2+</sup> ou Fe <sup>3+</sup> , calcinados a 1000°C e as respetivas fichas PDF utilizadas para a identificação das fases presentes. (b) ampliação do difratograma (a) em $2\theta = 25\text{-}30^\circ$ . (c) ampliação do difratograma (a) em $2\theta = 30\text{-}35^\circ$ .....	54
<b>Figura 22</b> - Espectro FT-IR dos pós de TCP-Fe com 7 e 10 mol.% de Fe, obtidos com os precursores de diferentes estados de oxidação do íão Fe (Fe <sup>2+</sup> e Fe <sup>3+</sup> ), calcinados a 1000°C. ....	55
<b>Figura 23</b> - Imagens dos pós TCP-Fe obtidos com diferentes teores de ferro e estado de oxidação do íão precursor, calcinados a 1000°C. ....	56
<b>Figura 24</b> - Distribuição dos tamanhos de partícula dos pós de TCP-Fe obtidos com 7 e 10 mol% de ferro usando Fe <sup>2+</sup> e Fe <sup>3+</sup> como precursores do íão Fe, calcinados a 1000°C e peneirados a 40 $\mu\text{m}$ . ....	57
<b>Figura 25</b> - Micrografias obtidas por SEM dos pós com os diferentes estados de oxidação do íão Fe precursor (Fe <sup>2+</sup> / Fe <sup>3+</sup> ) com as ampliações a) x1K; b) x10K; e respetivo mapeamento da superfície, c). ....	58

- Figura 26** - (a) Difractogramas dos pós de fosfatos de cálcio dopados com 7 mol% de Fe (II) e (III), calcinados a 1000°C e a 1100°C e as respectivas fichas PDF utilizadas para a identificação das fases presentes: 04-006-9376 ( $\beta$ -TCP), 04-008-4393 [ $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ ] e 04-007-9266 ( $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ); (b) ampliação do difratograma (a) entre  $2\theta = 25$  e  $30^\circ$  e (c) ampliação do difratograma (a) entre  $2\theta = 30$  e  $35^\circ$ . ..... 60
- Figura 27** - Espectro FT-IR dos pós de TCP-7Fe obtidos com precursor  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  calcinados a diferentes temperaturas, 1000°C/1100°C. .... 61
- Figura 28** - Imagens dos pós TCP7Fe obtidos com precursor  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ , calcinados a 1000 e 1100°C e peneirados a  $40 \mu\text{m}$ . A – TCP7 $\text{Fe}^{2+}$  - 1000; B – TCP7 $\text{Fe}^{2+}$  - 1100; C - TCP7 $\text{Fe}^{3+}$  - 1000; D – TCP7 $\text{Fe}^{3+}$  - 1100..... 62
- Figura 29** - Distribuição do tamanho de partícula dos pós TCP-7 $\text{Fe}^{2+}$  e TCP-7 $\text{Fe}^{3+}$ , calcinados a 1000°C e 1100°C e peneirados a  $40 \mu\text{m}$ . .... 63
- Figura 30** - Micrografias obtidas por SEM dos pós com os diferentes estados de oxidação do íon Fe precursor ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) e das diferentes temperaturas de calcinação com as ampliações a) x1K; b) x10K..... 64
- Figura 31** – Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado: a) pós TCP- $\text{Fe}^{2+}$  calcinados a 1000°C b) ampliação de a); c) aumento da magnetização a 40000 Oe com o aumento do teor de ferro..... 65
- Figura 32** - Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado: a) TCP- $\text{Fe}^{3+}$  calcinados a 1000°C onde b) é uma ampliação de a). .... 66
- Figura 33** - Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado: a) TCP7 $\text{Fe}^{2+}$  e TCP7 $\text{Fe}^{3+}$  calcinados a 1100°C onde b) é uma ampliação de a) ..... 67
- Figura 34** - Ensaio de viabilidade celular em células pré-osteoblásticas MC3T3 expostas durante 7 dias aos pós TCP-Fe – estudo do efeito do teor de ferro, do estado de oxidação do íon ferro precursor e da temperatura de calcinação. .... 68
- Figura 35** - Medida atividade da fosfatase alcalina (ALP) no meio de cultura ao dia 7 de ensaio das células MC3T3 expostas aos pós TCP-Fe. .... 69

<b>Figura 36</b> – Resumo das várias etapas do procedimento experimental. ....	77
<b>Figura 37</b> - Esquema do procedimento seguido para a medição dos tempos de presa inicial e final dos CPCs.....	78
<b>Figura 38</b> - Esquema do aparato utilizado para os ensaios de injetabilidade dos CPCs. ....	79
<b>Figura 39</b> - Esquema representativo das forças que atuam na amostra na medição de densidade aparente pelo método de imersão em mercúrio (adaptado).....	81
<b>Figura 40</b> - Densímetro de mercúrio para sólidos. ....	82
<b>Figura 41</b> - Difrátogramas de raios X dos pós TCP-Fe e HTCP7Fe <sup>3+</sup> calcinados a 1100°C, usados nas formulações dos cimentos testados e as respectivas fichas PDF utilizadas para a identificação das fases presentes: 04-006-9376 (β-TCP), 04- 015- 7245 (HA), 04-008-4393 [Ca <sub>9</sub> Fe(PO <sub>4</sub> ) <sub>7</sub> ] e 04-007-9266 (α-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ).....	83
<b>Figura 42</b> - Distribuição do tamanho de partícula dos pós obtidos após moagem e peneirados a 40 μm.....	85
<b>Figura 43</b> - Micrografias obtidas por SEM dos pós selecionados para as diferentes formulações de CPCs, após moagem e peneiração: A – TCP0Fe-1100; B – TCP3Fe <sup>2+</sup> -1100; C – TCP7Fe <sup>2+</sup> -1100; D – HTCP7Fe <sup>3+</sup> -1100. ....	86
<b>Figura 44</b> - a) Tempos inicial (IST) e final (FST) das formulações de CPCs contendo diferentes proporções de TCP7Fe <sup>2+</sup> -1100, MCPM e HTCP7Fe-1100, usando água como líquido de presa numa RLP de 0,30 mL·g <sup>-1</sup> ; b) Fases cristalinas das várias composições. Composição 1: 58,08% TCP7Fe <sup>2+</sup> -1100 + 26,92% MCPM + 15% HTCP7Fe <sup>3+</sup> -1100, Composição 2: 49,74% TCP7Fe <sup>2+</sup> -1100 + 35,26% MCPM + 15% HTCP7Fe <sup>3+</sup> -1100 e Composição 3: 51,60% TCP7Fe <sup>2+</sup> -1100 + 32,81% MCPM + 15,59% HTCP7Fe <sup>3+</sup> -1100. ....	87
<b>Figura 45</b> - Tempos inicial (IST) e final (FST) das diferentes formulações de CPCs com diferentes RLP; (**) FST não contabilizado, sendo bastante superior a 180 min. ....	88

<b>Figura 46</b> - Percentagem de pasta extrudada em função da RLP para as composições cimentícias CPC3Fe e HCPC7Fe. ....	89
<b>Figura 47</b> - (a) Resistência à compressão b) percentagem de porosidade e (c) fases cristalinas das diferentes composições de CPC com RLP= 0,30 e 0,24 mL·g <sup>-1</sup> , após 48 horas em PBS. ....	90
<b>Figura 48</b> - Micrografias obtidas por SEM dos diferentes CPCs com RLP 0,24 e 0,30 mL·g <sup>-1</sup> com as ampliações a) x400; b) x1K; c) x10K; e respetivo mapeamento da superfície à fratura, d). ....	92
<b>Figura 49</b> – Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado.	93
<b>Figura 50</b> – Curva de magnetização em função do campo aplicado das nanopartículas de magnetite. ....	94
<b>Figura 51</b> – Temperatura vs. Tempo: Curvas dos pós precursores do cimento HCPC7Fe: TCP7Fe <sup>2+</sup> -1100 e HTCP7Fe <sup>3+</sup> -1100. ....	95
<b>Figura 52</b> – Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado dos vários pós TCP-Fe. ....	113



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Propriedades mecânicas dos ossos cortical e trabecular.....	9
<b>Tabela 2</b> - Principais compostos de fosfatos de cálcio (adaptado).....	20
<b>Tabela 3</b> - Nomenclatura atribuída aos pós de TCP dopados com ferro, onde “y” corresponde ao estado de oxidação do íon ferro, $Fe^{2+}$ ou $Fe^{3+}$ , do reagente precursor e “xxx” corresponde à temperatura de calcinação (1000°C ou 1100°C). .....	40
<b>Tabela 4</b> - Quantificação das diferentes fases cristalinas presentes nos pós de fosfatos de cálcio dopados com diferentes concentrações de ferro obtida por refinamento de Rietveld. ....	46
<b>Tabela 5</b> - Análise quantitativa de fases obtida por refinamento de Rietveld. ....	54
<b>Tabela 6</b> - Análise de fases quantitativa obtida por refinamento de Rietveld dos pós estudados. ....	60
<b>Tabela 7</b> - Composições testadas com a adição do pó HTCP7Fe <sup>3+</sup> -1100, com água como líquido de presa e uma razão líquido/pó de 0,30 mL.g <sup>-1</sup> . ....	75
<b>Tabela 8</b> - Composições das diferentes pastas cimentícias estudadas com ácido cítrico como líquido de presa e uma razão líquido/pó de 0,24 e 0,30 mL.g <sup>-1</sup> . ....	76
<b>Tabela 9</b> - Análise de fases quantitativa obtida por refinamento de Rietveld dos pós escolhidos para as diferentes formulações de CPCs.....	84



## Índice de Abreviaturas

AC	Ácido cítrico
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
ALP	Fosfatase alcalina
AMF	Campo magnético alternado
BCP	Fosfato de cálcio bifásico
CaP	Fosfato de cálcio
CDHA	Hidroxiapatite deficiente em cálcio
CPC	Cimento de fosfato de cálcio
CPP	Pirofosfato de cálcio
CT	Tempo de coesão
DCPD	Fosfato bicálcico dihidratado ou bruchite
DCP	Fosfato bicálcico
DCPA	Fosfato bicálcico anidro ou monetite
FA	Fluorapatite
FST	Tempo de presa final
HA	Hidroxiapatite
IST	Tempo de presa inicial
MCPA	Fosfato monocálcico anidro
MCPM	Fosfato monocálcico monohidratado
MNP	Nanopartículas magnéticas
MRI	Ressonância magnética
NP	Nanopartículas
OS	Osteossarcoma
PMMA	Polimetacrilato de metilo
RC	Resistência à compressão
RLP	Razão líquido/pó
RTD	Resistência à tração diametral
SMF	Campo magnético estático
SPION	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro
TCP	Fosfato tricálcico
$\alpha$ -TCP	Fosfato tricálcico $\alpha$

$\beta$ -TCP	Fosfato tricálcico $\beta$
TP	Tempo de presa
TTCP	Fosfato de cálcio tetrahidratado

## **Enquadramento teórico e objetivos**

## **Enquadramento geral**

O aparecimento de doenças ósseas (tais como a osteoporose, osteomielite e tumores malignos) e de acidentes traumáticos acompanha o envelhecimento do ser humano. A osteoporose, por exemplo, é uma das doenças cada vez mais comuns, muito devido ao aumento da esperança média de vida. Esta é caracterizada pela perda de densidade da matriz óssea, com conseqüente aumento de porosidade óssea. Esta fragilidade ao nível do osso pode resultar no aumento do risco de fraturas, em deformações ósseas, dor, rigidez, entre outras sequelas. Esta doença requer preenchimento de lesões, por vezes de difícil acesso como no caso de fraturas na coluna vertebral.<sup>1-3</sup>

Além das doenças degenerativas, lesões ósseas causadas por doenças cancerígenas do próprio tecido ósseo ou tecidos circundantes são também muito frequentes, sendo necessário encontrar soluções de substituição óssea viáveis, quer para o paciente quer para os clínicos cirúrgicos (colocação dos substitutos ósseos e sua fixação). No caso de um tumor ósseo maligno, os tecidos ósseos infetados podem ser removidos através de cirurgia ou por outros procedimentos. Estes podem ser a ablação por radiofrequência ou por micro-ondas e, ainda, a terapia térmica induzida por laser, sendo difícil eliminar completamente as células ósseas tumorais. Essas células cancerígenas residuais podem levar a uma reincidência do tumor, assim como os tratamentos podem deixar queimaduras na pele, equimoses, limitando a aplicação extensiva destas possíveis formas de tratamento. Como alternativa de tratamento surge a hipertermia. A hipertermia, abordagem terapêutica já utilizada em combinação com outras terapias de cancro como a quimioterapia e a radioterapia, é uma técnica que consiste no aquecimento do local específico tumoral – pode ser do corpo inteiro, de uma parte do corpo ou de um tecido específico - e matar as células cancerígenas. O intervalo de temperatura deste tratamento é entre os 39°C e os 46°C, por forma a causar necrose das células tumorais sem danificar o tecido normal circundante.<sup>4</sup> Este efeito hipertérmico pode ser obtido por diferentes mecanismos, destacando-se neste trabalho a indução magnetotérmica. Todavia, para além do efeito hipertérmico em materiais com propriedades magnéticas, estudos anteriores

demonstraram que a aplicação de um campo magnético pode estimular de forma significativa a diferenciação e proliferação de osteoblastos, e fatores de crescimento, acelerando a osteointegração e a formação de novo osso.<sup>5</sup>

Nos últimos anos, tem-se vindo a assistir a um interesse crescente pela engenharia de tecidos, com foco na investigação de novos biomateriais para substituição óssea, com um papel mais ativo no corpo humano, ou seja, que possam restaurar, manter ou melhorar as funções do tecido normal ou com algum tipo de patologia.<sup>6</sup> Para esse efeito, as propriedades físico-químicas que o biomaterial apresenta para a resolução do problema, e o seu desempenho biológico, em particular nas interfaces material/tecido, são fundamentais. O desenvolvimento de técnicas cirúrgicas para a resolução destas complicações ósseas também tem vindo a ser estudado para que estas se tornem menos invasivas, reduzindo assim o período de convalescença dos pacientes.<sup>7</sup>

De entre os vários biomateriais existentes para substitutos ósseos são de destacar os cimentos ósseos injetáveis. Segundo *Chow LC*,<sup>8</sup> os primeiros cimentos à base de fosfatos de cálcio (CPCs) surgem nos anos 80 e apresentam-se como biocompatíveis, bioativos, osteocondutores, com reações de presa fracamente exotérmicas (durante a qual praticamente não retrai), potencialmente biodegradáveis e osteoindutores, possuindo uma composição mineralógica muito semelhante à do osso, propriedades essas que tornam estes materiais interessantes candidatos para serem usados como substitutos ósseos.<sup>9-11</sup> No entanto, as formulações comercialmente disponíveis continuam a sofrer de vários problemas,<sup>12,13</sup> tais como: (i) baixa resistência mecânica, o que limita a sua aplicação em locais que sofrem forças de tensão e compressão mais elevadas;<sup>14</sup> (ii) fraca coesão e injetabilidade impedindo o seu uso em técnicas cirúrgicas minimamente invasivas; (iii) desajuste iónico em relação à composição óssea limitando o seu desempenho biológico. Sendo assim, as falhas apresentadas justificam o contínuo esforço da investigação dedicada aos CPCs.<sup>14</sup> A dopagem dos pós precursores de fosfato de cálcio com diferentes iões tem-se revelado vantajosa, com resultados bastante positivos na melhoria de propriedades mecânicas, injetabilidade e desempenho biológico.<sup>15-17</sup>

## Objetivos

O objetivo principal deste trabalho de investigação é a obtenção de um cimento multifuncional injetável, com propriedades magnetotérmicas e capacidade regenerativa.

Para atingir estas propriedades, a estratégia passou por sintetizar pós à base de fosfatos de cálcio dopados com iões ferro, na tentativa de obter pós e, posteriormente cimentos, sensíveis a um campo magnético externo. Numa segunda fase, após caracterização dos pós obtidos, foram selecionados dois pós dopados com diferentes concentrações de ião ferro (3 e 7 mol.%) e um pó de controlo não dopado, para a preparação de pastas cimentícias e cimentos endurecidos.

Para uma melhor compreensão do trabalho realizado nesta dissertação, este documento encontra-se dividido em quatro Capítulos:

- **Capítulo 1 | Estado da Arte:** neste capítulo é apresentada a revisão da literatura, onde são abordados tópicos importantes para a compreensão do trabalho e do seu objetivo.

- **Capítulo 2 | Obtenção e caracterização de pós de fosfatos de cálcio não dopados e dopados com ferro:** este capítulo aborda com detalhe os procedimentos seguidos para a obtenção e caracterização dos pós de fosfatos de cálcio não dopados e dopados com iões ferro, bem como a discussão dos resultados obtidos. É apresentada uma nota introdutória ao capítulo e o seu objetivo, assim como as conclusões principais retiradas acerca dos resultados obtidos.

- **Capítulo 3 | Obtenção e caracterização de cimentos injetáveis:** neste capítulo é feita uma abordagem ao procedimento seguido para a obtenção dos cimentos e a respetiva discussão dos resultados obtidos. Engloba um enquadramento da temática e as conclusões principais retiradas sobre os resultados apresentados.

- **Capítulo 4 | Considerações gerais e trabalho futuro:** apresenta as considerações gerais do trabalho realizado, bem como as limitações encontradas ao longo do trabalho e sugestões para trabalho futuro.



## **Capítulo 1 – Estado da Arte**



## 1.1. Tecido ósseo

O corpo humano é constituído por vários sistemas que o fazem desempenhar as suas funções em total harmonia. Desses sistemas, um dos mais importantes é o sistema esquelético,<sup>1</sup> que é um sistema constituído por 206 ossos e que exerce funções de suporte, hematopoiese (processo de formação, desenvolvimento e maturação de células sanguíneas – na medula óssea) e proteção.<sup>18-20</sup> Segundo H. Matos Canhão<sup>20</sup>, o osso é um tecido conjuntivo vivo característico dos vertebrados e caracteriza-se pelo equilíbrio das suas propriedades – resistência e leveza, rigidez e flexibilidade.

### 1.1.1. Macro e microestrutura do osso

Os ossos que constituem o sistema esquelético não têm todos a mesma estrutura e podem ser divididos em 4 diferentes categorias baseadas na sua forma (Figura 1): ossos longos (comuns nas pernas e nos braços), ossos curtos (nos pulsos e tornozelos), ossos planos (grande parte dos ossos do crânio, peito, ombros e esterno) e ossos irregulares (na anca, vértebras...)<sup>19</sup>.

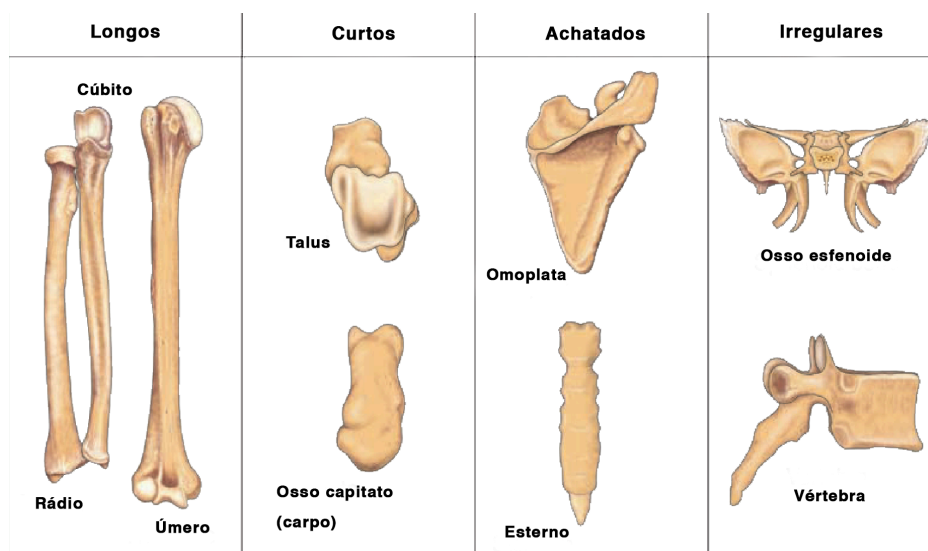
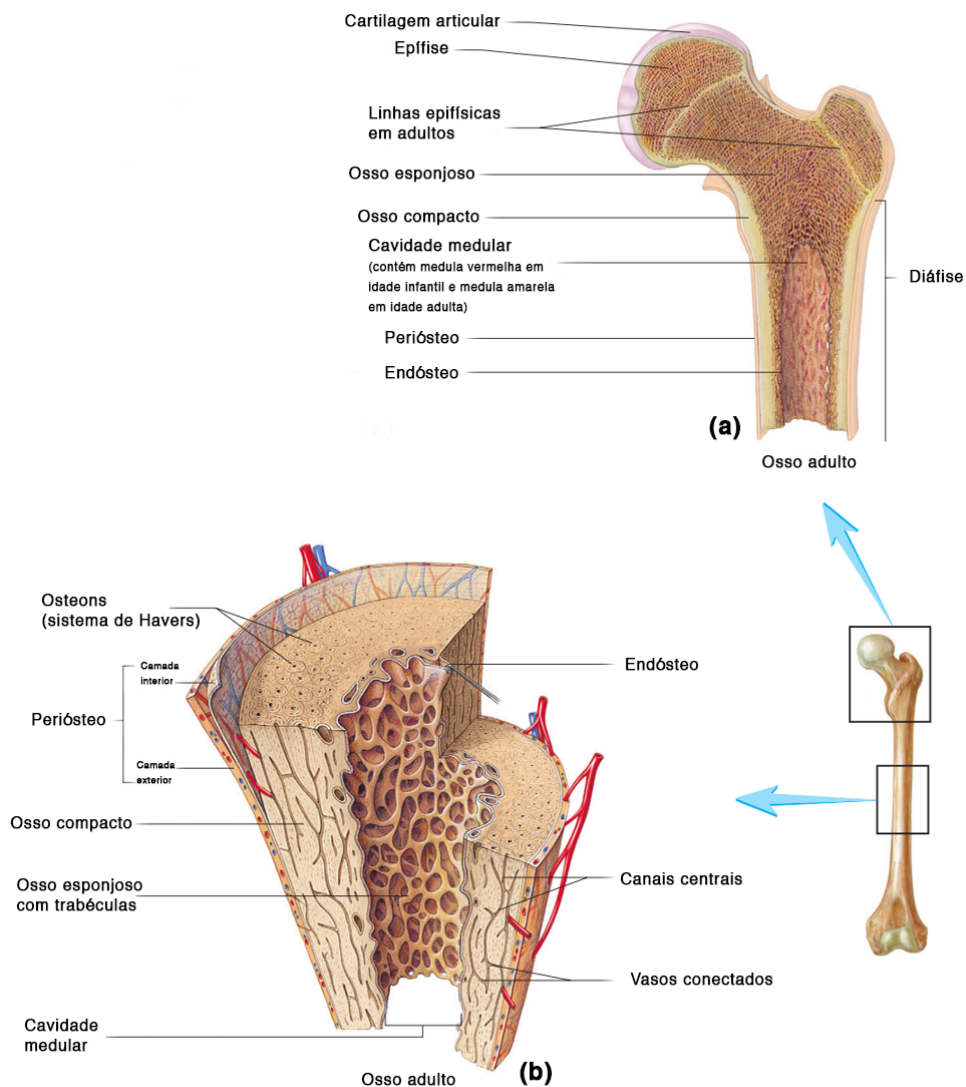


Figura 1 - Classificação dos ossos segundo a sua forma: longo, curto, plano e irregular (adaptado de <sup>19</sup>).

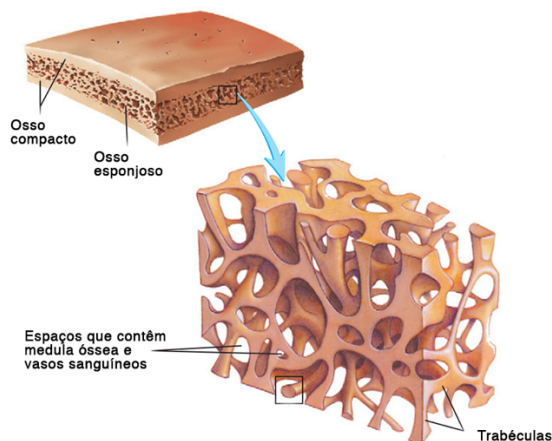
O osso longo é um bom exemplo para se falar da estrutura geral do osso. A Figura 2 apresenta as várias partes que o constituem, neste caso trata-se do fémur.

Na região central cilíndrica, encontra-se a diáfise que é composta maioritariamente por osso compacto, sendo também constituída por algum osso esponjoso, com mais porosidade. Nas extremidades do osso encontra-se a epífise, que é uma região mais arredondada e mais larga que a zona central, composta por osso esponjoso com uma camada externa de osso compacto.<sup>1</sup> É possível ainda verificar a existência de uma camada fina externa que recobre a superfície óssea, o perióstio. Este constituinte, membrana dupla de tecido conetivo fibroso, apresenta duas camadas em que a externa serve de revestimento protetor e a interna, camada osteogénica, é a camada onde se dá a osteogénese e a remodelação óssea.



**Figura 2 - Ilustração de um osso longo – fémur – onde são mostrados os componentes principais do mesmo como a diáfise e a epífise, bem como as linhas da epífise (a) e os componentes internos da diáfise (b). É mostrado que a epífise tem uma maior quantidade de osso esponjoso do que compacto e vice-versa na diáfise (adaptado de <sup>1</sup>).**

O osso compacto, também chamado de osso cortical é uma parte densa do osso, devido à perpendicularidade das fibrilhas de colagênio que formam uma *lamellae* concêntrica com as *lamellae* adjacentes. Contrariamente, o osso trabecular, ou esponjoso, tem uma matriz altamente porosa e pouco organizada (Figura 3).



**Figura 3 - Osso compacto ou cortical e osso trabecular ou esponjoso. O osso compacto mostra-se mais denso e organizado, enquanto o esponjoso é altamente poroso favorecendo a presença de medula óssea nesses espaços, assim como vasos sanguíneos (adaptado de <sup>1</sup>).**

Estas diferenças estruturais estão relacionadas com o papel ativo destas partes no osso como um todo – o osso cortical oferece função protetora e mecânica e o osso trabecular está envolvido nas funções metabólicas.<sup>21</sup> As propriedades mecânicas de ambos são bastante distintas, como se verifica na Tabela 1, no entanto, independentemente da resistência de cada um, a função de suporte é comum nos dois.<sup>22</sup>

**Tabela 1 - Propriedades mecânicas dos ossos cortical e trabecular.<sup>23</sup>**

Propriedade	Osso Cortical	Osso Trabecular
Resistência à Compressão (MPa)	100-230	2-12
Resistência à tração (MPa)	50-150	10-20
Deformação (%)	1-3	5-7
Tenacidade à fratura (MPa.m <sup>1/2</sup> )	2-12	-
Módulo de Young (GPa)	7-30	0.05-0.5

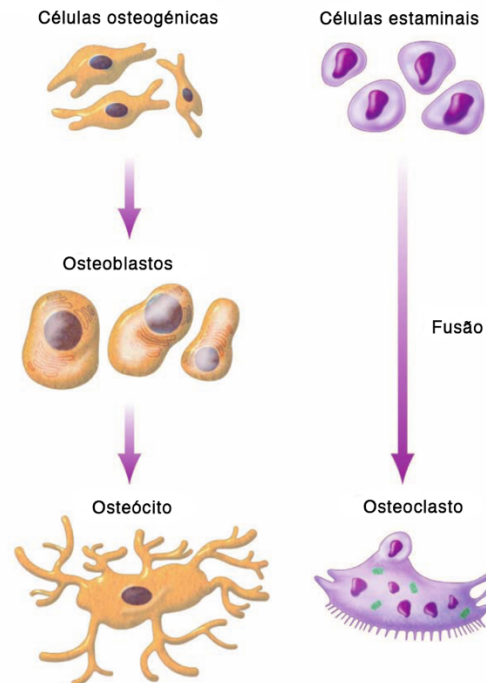
A matriz óssea é normalmente constituída por 35% de material orgânico (colagénio e protoglicanos) e 65% de material inorgânico. O material inorgânico consiste num fosfato de cálcio, a hidroxiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  – HA) com uma estrutura que forma uma célula unitária hexagonal. Devido ao pequeno tamanho de cristalite no osso, o padrão da difração de raios-X do osso mostra um alargamento dos picos o que torna difícil a identificação de fases inorgânicas presentes no osso.<sup>1,24</sup> É esta junção do colagénio com os componentes minerais que dá boas propriedades funcionais ao osso. Sem a parte orgânica, o osso torna-se demasiado frágil e sem a matéria mineral, o osso torna-se demasiado flácido e flexível.<sup>1</sup> Além de ser composto por matriz extracelular óssea, o osso também é constituído por células ósseas que produzem essa mesma matriz.

### *Células ósseas*

As células ósseas apresentam-se divididas em 3 classes e têm diferentes origens e diferentes funções. Osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são os tipos de células responsáveis pela manutenção do osso, quer da sua formação quer da sua remodelação.<sup>1</sup> Os osteoblastos são as células presentes na ossificação, células de formação óssea. Estas células que não se dividem, segregam uma matriz de colagénio e cálcio. A matriz segregada envolve os osteoblastos e calcifica – os osteoblastos ficam presos dentro da mesma e resulta numa mudança de estrutura celular, tornando-se em osteócitos.<sup>1,25,26</sup>

Os osteócitos são as células primárias do osso maduro e as células ósseas mais comuns. Cada osteócito está localizado num espaço próprio designado de lacuna rodeado de tecido ósseo. É por segregação de enzimas que os osteócitos mantêm a concentração mineral da matriz, mas à semelhança dos osteoblastos também não se dividem. Quando estas células atingem o seu limite são substituídas por células osteogénicas - células indiferenciadas e as únicas capazes de realizar o processo mitótico (divisão celular) – que se diferenciam em osteoblastos e substituem as células velhas (Figura 4).<sup>1,25</sup> Por forma a reciclar as células ou simplesmente para controlar a homeostasia do ião cálcio, os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção do tecido velho e são provenientes da fusão de células da medula óssea.<sup>19</sup> Estas células trabalham em

simultâneo com os osteoblastos, à medida que os osteoclastos reabsorvem as células velhas, os osteoblastos formam novo osso. Esta cooperação é responsável pelas pequenas reestruturações do osso.<sup>1,19,25</sup>

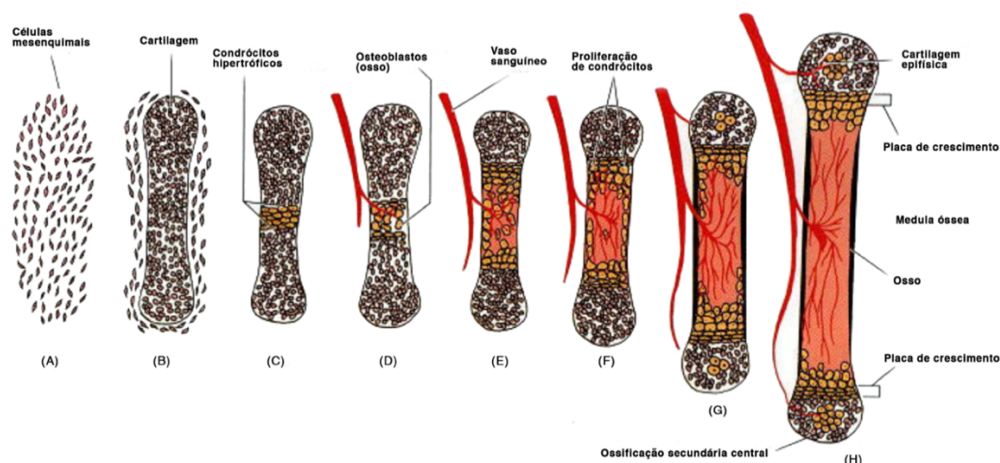


**Figura 4 - Formação das células ósseas – osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As células osteogênicas dão origem aos osteoblastos, que se desenvolvem em osteócitos. Os osteoclastos são provenientes de células estaminais (adaptado de <sup>19</sup>).**

### 1.1.2. Osteogênese

Osteogênese é o processo de desenvolvimento ósseo e começa na sexta semana da evolução embrionária. Existem duas formas de osteogênese: intramembranar ou endocondrial.<sup>19</sup> A ossificação intramembranar é característica dos ossos planos, como os do crânio e as clavículas. Durante este processo, os ossos cortical e trabecular desenvolvem-se a partir de tecido conectivo não-diferenciado. As células mesenquimais juntam-se para se diferenciarem em células especializadas – algumas diferenciam-se em células osteogênicas e depois em osteoblastos, que segregam uma matriz de colagénio e protoglicanos, capaz de ligar os sais de cálcio, tornando o osso calcificado. Este tipo de osteogênese começa no embrião e continua até à adolescência.<sup>25,27</sup>

A ossificação endocondrial é a substituição da cartilagem hialina por osso. A cartilagem não se transforma em osso, mas serve de molde para que este se consiga formar completamente e que a substitua. Este tipo de ossificação é comum nos ossos longos e nos ossos da base do crânio, envolvendo 5 etapas.<sup>25</sup> A Figura 5 mostra resumidamente os diferentes estágios.



**Figura 5 - Etapas da ossificação endocondrial; (A e B) Diferenciação de células mesenquimais para condrócitos e formação do modelo de cartilagem para o osso futuro. (C) Aumento de volume dos condrócitos e apoptose celular, enquanto a matriz extracelular é mudada e mineralizada. Favorecimento da entrada de vasos sanguíneos. (D e E) Entrada de osteoblastos pelos vasos sanguíneos, degeneração da matriz cartilaginosa e depósito de matriz óssea. (F-H) Formação óssea e crescimento do osso (adaptado de <sup>27</sup>).**

Numa primeira fase, as células mesenquimais estão comprometidas a desenvolverem-se em cartilagem. Na segunda fase, estas células condensam em nódulos compactos e diferenciam-se em condrócitos (células de cartilagem). Seguindo-se para uma terceira fase, em que os condrócitos se proliferam para formar posteriormente osso. Na fase seguinte, a quarta fase, os condrócitos param de se dividir e aumentam o seu volume, onde alteram a sua matriz e começam a ser mineralizados por carbonato de cálcio. Na quinta, e última fase, a cartilagem é invadida por vasos sanguíneos e os condrócitos hipertróficos morrem por apoptose celular. À medida que as células de cartilagem morrem, as células que rodeavam o modelo de matriz óssea diferenciam-se em osteoblastos e são estas células que começam a formar o osso.<sup>27</sup> Independentemente do tipo de osteogénese, ambos produzem inicialmente osso compacto e sofrem remodelação óssea. Após este processo, não é possível distinguir qual a forma de osteogénese seguida.<sup>1</sup>



### 1.1.3. Remodelação óssea

No sistema esquelético, à medida que o osso envelhece é substituído por novo osso. Este processo é designado remodelação óssea. O subprocesso da remoção do osso através dos osteoclastos designa-se reabsorção e a ossificação (processo anteriormente falado – 1.1.2. Osteogénese) é a formação de novo osso, processos que ocorrem simultaneamente.<sup>25,26</sup> Entre todas as funções da remodelação óssea, as principais concentram-se no crescimento e reparação óssea saudáveis, ajustes do osso à tensão exercida neles e regulação da concentração do ião cálcio no corpo humano.<sup>1</sup>

Um osso exposto a tensões fica sujeito a lesões ou fraturas. Por forma a reparar os danos, o osso passa por 4 etapas principais (Figura 6): (i) Formação de hematoma – vasos sanguíneos libertam sangue na área de dano; (ii) Formação de calo de fratura – pedaço de tecido que se forma na área da fratura. O calo interno liga as duas extremidades do osso partido e o calo externo forma uma película à volta das extremidades dos fragmentos ósseos; (iii) Ossificação do calo – substituição da cartilagem dos calos interno e externo por tecido ósseo esponjoso; (iv) Remodelação óssea – preenchimento das lacunas entre os fragmentos ósseos e substituição do tecido ósseo esponjoso por compacto.<sup>1,19,26</sup>

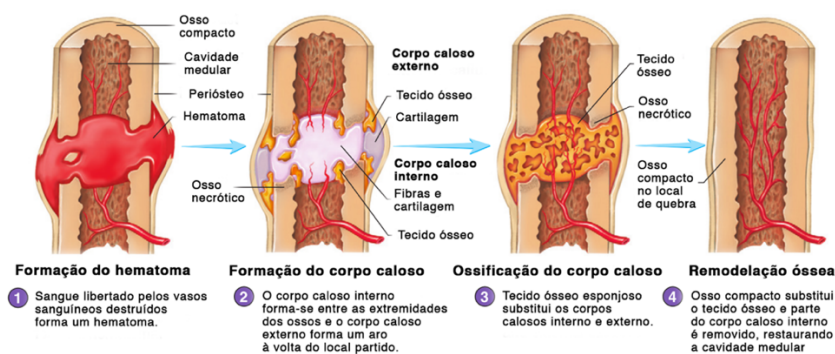


Figura 6 - Etapas da reparação óssea entre as quais, a remodelação se encontra no final por forma a completar o processo (adaptado de 1).

No caso de lesões, a remodelação apenas fica completa quando o tecido ósseo do calo interno e o “osso morto” adjacente à fratura são substituídos na totalidade por osso compacto.<sup>1</sup>

#### 1.1.4. Sarcomas ósseos

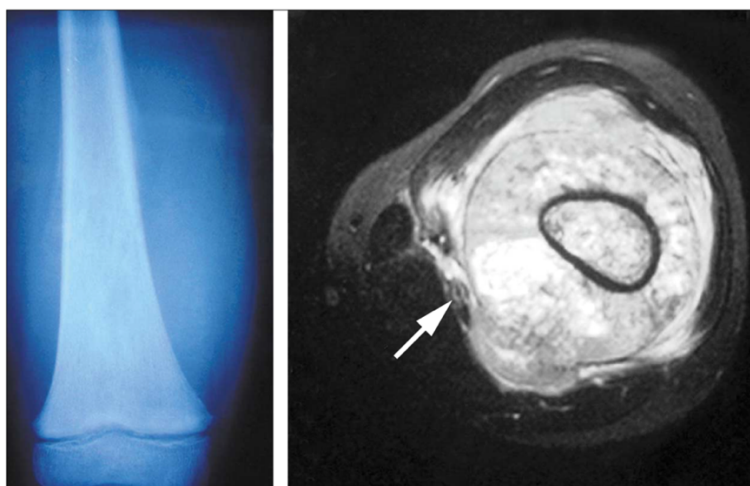
Segundo Robert G. Fenton e Dan L. Longo<sup>28</sup>, o cancro é uma doença genética, sinónimo de neoplasia maligna. É possível definir um cancro através de duas formas – pelo crescimento celular incontrolável ou pela invasão de tecidos/metástases. No primeiro caso, se o crescimento celular não invadir outros tecidos, é dado como uma característica de neoplasias benignas. Na invasão de tecidos, se esta ocorrer nos tecidos epiteliais os cancros são designados carcinomas, caso seja nos tecidos mesenquimais ou não epiteliais designam-se sarcomas.<sup>28</sup>

Os sarcomas são neoplasias raras do tecido conjuntivo de carácter maligno. Estes podem surgir nos tecidos moles (sarcomas de tecidos moles) ou no tecido ósseo (sarcomas ósseos) e são biologicamente diferentes dos cancros comuns. Os tumores ósseos malignos primários são a terceira maior causa de morte entre os adolescentes doentes com cancro, sendo os sarcomas ósseos mais comuns: osteossarcoma (OS, 45%), sarcoma de Ewing (15%) e condrossarcoma (22%), por esta ordem de importância.<sup>28,29</sup>

O osteossarcoma, do grego “*osteon*” que significa osso e “*sarkoma*” que significa crescimento carnudo, é um tumor maligno caracterizado pela produção de matriz osteoide (osso não mineralizado) de células malignas. Esta neoplasia corresponde a, aproximadamente, 20% de todos os sarcomas ósseos. Seguindo uma distribuição bimodal com um primeiro pico na segunda década de vida, durante o crescimento pubertário e, um segundo pico menor que ocorre em pacientes acima de 60 anos, apresenta-se com uma incidência maior no sexo masculino do que no feminino, com uma razão de 1,6:1.<sup>28-30</sup> O OS ocorre, geralmente, em áreas de crescimento de osso rápido, principalmente em ossos longos dos membros inferiores em adolescentes na puberdade - fémur distal, tibia proximal e úmero proximal - onde a atividade de divisão celular é elevada para facilitar o crescimento, mostrando-se um dos motivos para explicar a oncogénese associada ao OS. Nos pacientes idosos, é mais comum o OS aparecer em ossos chatos na maioria dos casos devido a um aumento da diversidade de locais para tumores primários. O aparecimento do OS em pacientes de idade avançada está, normalmente, relacionado com exposição a radiação prévia (como tratamento de outra patologia

anterior) ou com a doença de Paget - patologia resultante do aumento da resorção osteoclástica de osso, com o conseqüente aumento da atividade osteoblástica para compensar essa perda.<sup>28,30,31</sup>

O osteossarcoma não apresenta sintomas específicos a não ser a dor localizada, que pode ser intermitente no início. O aumento da dor sem existir infecção ou ferimento evidentes são sinais que requerem alguma preocupação e necessitam de ser avaliados física e histologicamente. Os sintomas podem aparecer alguns meses antes do diagnóstico definitivo de OS, por isso é fundamental um exame físico cuidado, pois pode revelar uma massa anormal ou movimentação reduzida das articulações, bem como um exame radiológico para um diagnóstico imediato que deverá revelar uma lesão destrutiva do osso com uma aparência como se fosse roído por traças, uma reação periosteal espiculada e uma bainha de nova formação óssea periosteal na margem da massa de tecido mole (triângulo de Codman).<sup>28-31</sup>



**Figura 7 - Osteossarcoma numa criança. A imagem mostra o triângulo de Codman - uma matriz subtil de tecido mole com uma reação periosteal anormal formando uma densidade triangular que se estende muito próximo das estruturas neurovasculares (seta).<sup>32</sup>**

Também deve ser incluída no diagnóstico uma biopsia para a confirmação da malignidade do tumor, frequentemente realizada com uma agulha para retirar um fragmento da massa tumoral, com a ajuda de ultrassons ou por tomografia computadorizada.<sup>28,29</sup>

Para que seja verdadeiro o diagnóstico de OS a produção de matriz osteoide está implícita, mas nem sempre esta existe com uma boa definição sendo também aceitável. Para isso, é necessário recorrer a outros aspetos que permitam a

identificação desta neoplasia. Após a biópsia em vários pontos, as células cancerígenas devem ser distinguidas das células normais por exame microscópico. Assim, é possível definir qual o grau de diferenciação do OS - alto, intermediário ou baixo - permitindo ao médico perceber o tipo de evolução esperada para o tumor e qual a melhor abordagem terapêutica a utilizar.<sup>31</sup> A maior parte dos OS são de alto grau, pelo que o mais importante para prolongar a sobrevivência do paciente é a resposta ao tratamento quimioterápico. A sobrevivência a longo prazo para pacientes com OS localizado melhorou para cerca de 60% devido à combinação de quimioterapia multiagente com a cirurgia. O tratamento mais comum para este tipo de pacientes é quimioterapia pré-operativa, cirurgia para remoção do tumor e quimioterapia pós-operativa.<sup>28,33</sup>

As terapias atuais baseiam-se em inúmeros fatores como a entidade do tumor, o estágio, a idade e o gênero do paciente, a condição geral do mesmo, a qualidade de vida, expectativa de vida, entre outros. Segundo K. Ando et al.<sup>33</sup> e S. Arifi et al.<sup>34</sup>, existem 3 opções terapêuticas principais, sendo elas: cirurgia, quimioterapia e radioterapia, no entanto, S. R. Patel e R. S. Benjamin<sup>28</sup> afirmam que o OS é radio-resistente, pelo que a radioterapia não é um procedimento de rotina.

A cirurgia é um procedimento indispensável no tratamento do osteossarcoma, sendo combinada com a quimioterapia. O objetivo deste procedimento é a remoção total do tumor com uma margem larga de tecido normal para evitar a reincidência e aumentar a sobrevivência. De acordo com o estágio do tumor, o local e a resposta à quimioterapia pré-operativa, a extensão da cirurgia pode variar existindo algumas opções como a amputação, a preservação do membro com reconstrução próstética ou biológica, em que se inclui a rotação de Van Nes - reconstrução de defeitos ósseos à volta do joelho após amputação do fêmur distal, onde a tíbia e o pé são rodados 180° e recolocados no coto femoral. O tornozelo opera como uma articulação do joelho funcional.<sup>33,35,36</sup>

A reconstrução dos membros tem um papel fundamental na qualidade de vida dos pacientes. Com uma endoprótese, estes podem obter mais rapidamente a sua mobilidade, bem como estabilidade e suporte do seu peso. Também apresentam desvantagens como infeção, alargamento da prótese, rigidez nas articulações, encurtamento/alongamento do membro e fratura do implante. Os autoenxertos são

comummente realizados usando enxertos de perônio vascularizado, por forma a preencher os defeitos diafisários do osso após a excisão extensiva do mesmo. Este tipo de reconstrução é mais indicado para os membros superiores, uma vez que o enxerto não confere força suficiente para sustentar o peso do paciente levando à possibilidade de fraturas de alto risco. Também os aloenxertos são usados para a reconstrução de defeitos ósseos, com resultados satisfatórios a longo prazo. Apesar de ter inúmeras vantagens como a integração biológica e a preservação da articulação, além dos riscos da reconstrução endoprotética acima referidos, também poderá ter a agravante da não união na junção do local hospedeiro e o enxerto.<sup>32,33,37</sup>

Uma vez que a cirurgia em si não é efetiva no tratamento do OS, como já foi referido, esta é combinada com quimioterapia pré- e pós-operatória. A quimioterapia neoadjuvante induz a necrose do tumor primário, facilitando assim a cirurgia e eliminando a possibilidade de micrometástases. A necrose do tumor é classificada por estádios: I - sem necrose; II - 50% a 90% de necrose; III - >95%, mas <100% de necrose; IV - 100% de necrose. A taxa de sobrevivência é estimada pela resposta do tumor à quimioterapia pré-operatória, bem como a quimioterapia pós-operatória é selecionada dependendo do grau de necrose tumoral induzida tendo em conta o tratamento prévio.<sup>33</sup>

Uma nova terapia consistindo em hipertermia regional (tema desenvolvido seguidamente, em 1.5 neste documento) em conjunto com a quimioterapia pré-operatória também é uma hipótese estudada como uma boa alternativa para erradicar as células tumorais. Estudos randomizados mostraram que a taxa de resposta ao tratamento foi mais elevada nos pacientes com um tratamento combinado de quimioterapia e hipertermia regional do que em pacientes só com o tratamento quimioterápico. Com isto, esta estratégia terapêutica oferece novas opções de tratamento para os pacientes e permite um maior controlo sobre o local do tumor, facilitando a consequente cirurgia.<sup>34,38</sup>

## **1.2. Biomateriais como substitutos ósseos**

Os biomateriais sintéticos têm vindo a ser cada vez mais estudados por forma a combater as desvantagens dos auto e aloenxertos – fragmentos de osso do paciente ou de um dador, respetivamente. Estes podem ser classificados em: (i) bioinertes – materiais que não reagem com o organismo e que não se degradam com o tempo (primeira geração), (ii) osteocondutores e bioativos (segunda geração), e (iii) materiais osteoindutores - que estimulam a síntese de novo osso (terceira geração).<sup>23</sup>

O risco do uso de materiais inertes é a possibilidade de rejeição e reações inflamatórias. Estes materiais não afetam a síntese de novo tecido ósseo, mas há formação de tecido fibroso na superfície do material que é implantado. Os biomateriais de primeira geração são muito usados nas cirurgias ortopédicas do joelho e da anca, no entanto, tem sido requerido uma melhoria nas características destes implantes para que sejam mais tolerados pelo corpo, por exemplo, tornar as características dos mesmos o mais semelhante possível às características do osso e, uma vez que o meio do organismo humano é altamente corrosivo, inibir processos de corrosão neste tipo de materiais.<sup>23,39</sup>

Os biomateriais osteocondutores, bioativos e osteoindutores, denominados de segunda e terceira geração, apresentam características biodegradáveis. A habilidade que os materiais têm de interagirem com o ambiente corporal humano sem causar danos de forma negativa, ajudando na reparação local mais rapidamente, designa-se bioatividade. A osteocondutividade é a capacidade de um material conseguir manter o osso com as suas funções normais e ajudar na formação de novo tecido ósseo. A osteoindutividade, propriedade característica da terceira geração de biomateriais, é a possibilidade de um material formar tecido ósseo, sendo necessária a presença de fatores celulares indutores, como fatores de crescimento, células ou enzimas.<sup>14,23,40</sup>

Têm-se feito estudos que mostram a capacidade osteoindutora dos biomateriais à base de fosfatos de cálcio, sendo algo que necessita ser melhor explorado porque o mecanismo biológico de osteoindução ainda não é totalmente compreendido. Estes materiais são bioativos e osteocondutores e são considerados potencialmente osteoindutores.<sup>14,23,41</sup>

### 1.2.1. Substitutos ósseos à base de fosfatos de cálcio

Os biomateriais à base de fosfatos de cálcio são estudados há já cerca de 100 anos.<sup>14</sup> São materiais com grande interesse devido à semelhança química com a parte inorgânica do osso. Estes podem apresentar-se na forma de blocos densos ou porosos, grânulos, nem sempre vantajosos para o preenchimento de defeitos ósseos ou de fraturas de difícil acesso.<sup>10,18</sup> Os cimentos, também substitutos ósseos, aparecem com grande interesse nesta área de regeneração óssea. Estes vêm colmatar as desvantagens que os outros tipos de substitutos apresentam, pois são potencialmente injetáveis e moldáveis, o que permite o uso de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, diminuição do período de convalescença do paciente e risco de infeções e, como foi mencionado, apresentam boas propriedades bioativas e osteocondutoras, degradam-se com o tempo e são potencialmente osteoindutores.<sup>10,18</sup>

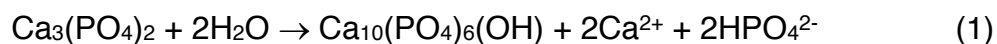
#### *Fosfatos de cálcio*

Estes minerais, quando puros, possuem uma cor branca, podendo ter uma alteração de cor na presença de impurezas ou dopantes, como o caso do ferro e de outros elementos terrosos. Combinações entre os óxidos de cálcio e de fósforo fornecem uma variedade de fosfatos de cálcio que podem ser distinguidos em três grupos, dependendo do anião fosfato: (i) ortofosfatos – baseados em  $\text{PO}_4^{3-}$  e os mais conhecidos e usados nas composições de CPCs; (ii) metafosfatos – baseados em  $\text{PO}_3^-$ ; (iii) pirofosfatos –  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ , que apresentam cada vez mais interesse para a utilização em cimentos.<sup>14,42,43</sup>

Existem duas formas de obtenção de fosfatos de cálcio que devem ser distinguidas. Os CaPs podem ser obtidos por precipitação de solução aquosa à temperatura ambiente ou obtidos por reação do estado sólido, que consoante a razão Ca/P apresentam fórmulas e propriedades distintas entre si (Tabela 2).<sup>44</sup>

As fases estáveis dos CaPs dependem da temperatura e da presença de água durante o processo de obtenção, ou do meio biológico onde é inserido. À temperatura corporal, em contacto com os fluidos, duas fases são estáveis para pH menores e maiores que 4,2 respetivamente – a bruchite e a hidroxiapatite. Para

temperaturas mais elevadas, outras fases como o  $\beta$ -TCP e o TTCP são formadas.<sup>28</sup> Fases de fosfatos de cálcio não hidratadas e obtidas a temperaturas elevadas, como é o caso do  $\beta$ -TCP, ao interagir com a água ou *in vivo*, transforma-se em hidroxiapatite, como mostra a reação da equação 1.<sup>39,45</sup>



**Tabela 2 - Principais compostos de fosfatos de cálcio (adaptado de <sup>43,44</sup>).**

Nome	Razão Ca/P	Símbolo	Fórmula química	Mineral
Fosfato monocálcico monohidratado	0,5	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-
Fosfato bicálcico dihidratado	1,0	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Bruchite
Fosfato bicálcico	1,0	DCP	$\text{CaHPO}_4$	Monetite
Fosfato octacálcico	1,33	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-
$\alpha$ -Fosfato tricálcico	1,5	$\alpha$ -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-
$\beta$ -Fosfato tricálcico	1,5	$\beta$ -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-
Fosfato de cálcio amorfo	1,2-2,2	ACP	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ $n = 3-4.5$	ACP
Hidroxiapatite deficiente em cálcio	1,5-1,67	CDHA	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	-
Hidroxiapatite	1,67	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatite
Fluorapatite	1,67	FA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	-
Fosfato tetracálcico	2	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	Hilgenstockite



Uma propriedade importante dos CaPs é a solubilidade em água, pois o comportamento *in vivo* destes compostos pode ser previsto por esta propriedade.<sup>46</sup> Isto é, se a solubilidade do CaP for menor que a solubilidade da parte mineral do osso a degradação do biomaterial será lenta, se for o oposto (CaP com maior solubilidade) a degradação do mesmo será rápida.<sup>44</sup> Esta característica pode ser verificada na Figura 8, onde se observa a variação da solubilidade com o pH para os diferentes CaPs. A HA é o composto menos solúvel para valores de pH neutro a básico e os DCPD e DCPA são os menos solúveis para valores de pH ácido.<sup>14,44</sup> Pela análise das curvas da Figura 8 pode dizer-se que, por ordem crescente, a taxa de degradação dos CaPs a  $\text{pH} \approx 7$  será <sup>14,44</sup>:

MCPM > TTCP  $\approx$   $\alpha$ -TCP > DCPD > DCP > OCP >  $\beta$ -TCP > HA

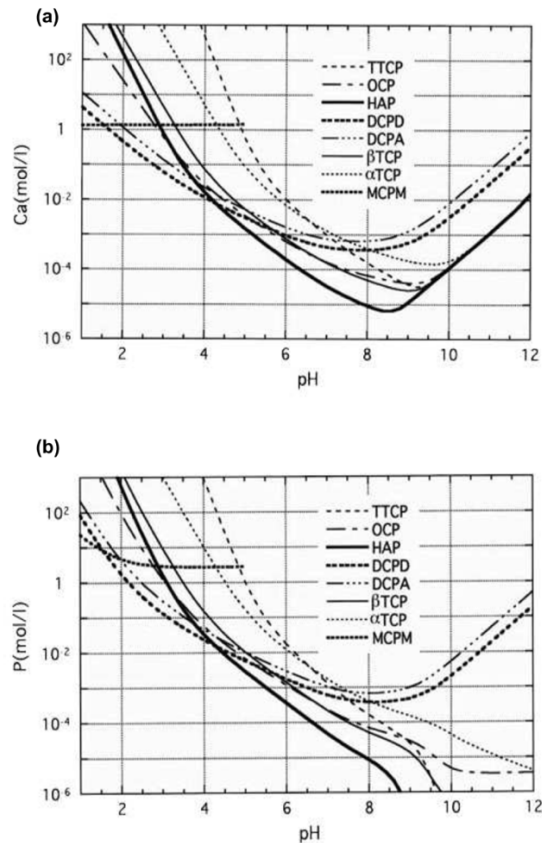


Figura 8 - Solubilidade do (a) Ca e do (b) P para os diferentes valores de pH nos diferentes compostos de CaP (HAP – Hidroxiapatite).<sup>14</sup>

No presente trabalho, serão usados os seguintes fosfatos de cálcio na obtenção de CPCs:

(1) Fosfato monocálcico monohidratado ou MCPM – é o CaP mais ácido e o mais solúvel para quase todos os pH. Devido a estas particularidades não é biocompatível e por isso não é usado sozinho para as aplicações de substituição óssea, mas é muito combinado com outros CaPs como o  $\beta$ -TCP.<sup>12,14</sup>

(2) Fosfato tricálcico ou TCP – é a matéria-prima mais usada nos materiais de reparação óssea, tanto na fase  $\beta$  como na fase  $\alpha$ .<sup>12,47</sup>

-  $\beta$ -TCP é uma fase de alta temperatura que se mantém estável da temperatura ambiente até 1125°C e pode ser obtido a partir de 800°C. Desde os 1125°C até 1430°C, este composto transforma-se para a fase  $\alpha$ . Também pode ser combinado com a HA formando um fosfato de cálcio bifásico (BCP) também muito usado em biomateriais para substituição óssea devido à possibilidade de controlo da velocidade de reabsorção pelo organismo dependendo da razão HA/ $\beta$ -TCP.<sup>10,14,48</sup>

-  $\alpha$ -TCP também é uma fase de alta temperatura, obtida a partir de  $\beta$ -TCP. Ambos os compostos apresentam a mesma composição química, no entanto, o que os distingue é a estrutura cristalográfica que com o aumento da temperatura muda de romboédrica ( $\beta$ -TCP) para monoclinica ( $\alpha$ -TCP) (Figura 9). Este composto é também biocompatível, mas mais solúvel e biodegradável que na fase  $\beta$ , sendo mais reativo em sistemas aquosos, incluindo nos fluidos corporais.<sup>13,14,44,49</sup>

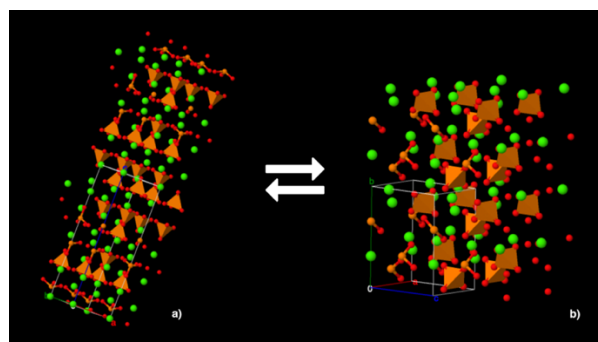


Figura 9 - Modificação de estrutura cristalográfica do  $\beta$ -TCP para  $\alpha$ -TCP com o aumento da temperatura em que a) é estrutura romboédrica e b) estrutura monoclinica.<sup>44</sup>

(3) Fosfato bicálcico dihidratado (DCPD) ou bruchite – composto de caráter ácido com estrutura cristalina monoclinica, formada por cristais em forma de plaquetas ou de agulhas.<sup>14</sup> A sua forma desidratada, monetite (DCPA), raramente é obtida à temperatura ambiente por precipitação aquosa, mas por aquecimento da bruchite entre 120°C e 170°C.<sup>50,51</sup> O DCPD é o composto menos solúvel para valores de pH ácido, mas como é um composto metastável é usado como material de substituição óssea na forma de cimentos – é biocompatível, biodegradável e osteocondutor. *In vivo* é facilmente convertido em HA (equação 1).<sup>12,44</sup>

A composição química e a porosidade são fatores que tornam os CaPs mais ou menos degradáveis. Por exemplo, materiais de HA que apresentem baixa porosidade, são praticamente inertes e não geram bioatividade entre o tecido ósseo e o material. No entanto, as fracas propriedades mecânicas dos CaPs limitam a aplicação destes a locais que não sejam sujeitos a grandes cargas.<sup>13,14,47,49,50,52</sup>

### **1.2.2. Substituição iônica em fosfatos de cálcio**

São vários os íons que estão presentes nas apatites biológicas e que fazem parte da composição de tecidos duros como o osso, o esmalte e a dentina. Entre esses íons podem-se destacar o magnésio (Mg) e o estrôncio (Sr) e em quantidades menores, o manganês (Mn) e o ferro (Fe).<sup>14,53</sup> Estes elementos têm uma certa relevância em vários processos biológicos, como é o caso do Mg que influencia o metabolismo ósseo ou o caso do Sr que é benéfico no tratamento da osteoporose prevenindo a perda de densidade óssea.<sup>14,54</sup>

O Fe também é um micronutriente essencial em vários processos biológicos. Segundo S. Gomes *et al.*<sup>55</sup>, o ferro representa cerca de 35 e 45 mg/Kg do peso corporal num adulto feminino e masculino, respetivamente. A concentração do ferro no osso é mínima, indicando que a presença deste no corpo não perturba a estrutura e função apatítica do osso.<sup>56</sup> A incorporação destes íons em apatites sintéticas altera as propriedades dos CaPs, tanto a nível de estrutura, como a nível físico-químico (parâmetros de rede, cristalinidade, solubilidade, reabsorção,

bioatividade, entre outros), sendo uma mais valia no controlo das propriedades requeridas consoante a aplicação-alvo.<sup>57-59</sup>

Na dopagem dos CaPs com ferro, a apatite magnética pode ser uma alternativa bioativa, bioreabsorvível e não-tóxica à magnetite ou a terapias magnéticas como a hipertermia.<sup>17</sup>

Apesar de existirem alguns estudos de sínteses de dopagens dos pós de CaPs com os iões acima referidos, não tem sido estudado com profundidade o caso dos CPCs dopados com Fe. É nessa dopagem e no fabrico de CPCs de bruchite dopados com ferro que esta dissertação se foca – quais os efeitos da dopagem, tanto a nível estrutural como a nível de efeitos biológicos.

### **1.3. Cimentos ósseos à base de fosfatos de cálcio**

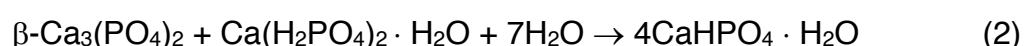
Os cimentos ósseos são biomateriais constituídos por uma fase sólida (pó) e uma fase líquida, que ao misturar formam uma pasta que pode ter viscosidades variadas dependentes de fatores como: a composição do líquido de presa, razão líquido/pó, tamanho e distribuição de tamanhos de partícula, composição do pó, entre outras.<sup>60</sup> Descobertos por *Brown* e *Chow* nos anos 80<sup>8</sup>, este biomaterial cerâmico realiza uma reação de presa e endurece, tanto à temperatura ambiente como à temperatura corporal. Atualmente conhecidos como cimentos de fosfatos de cálcio (CPC), apresentam grande aptidão para a regeneração óssea. O cimento resultante da reação de presa contém uma ou várias fases cristalinas de fosfatos de cálcio, que podem interferir nas suas propriedades.<sup>61</sup>

A obtenção de pastas cimentícias de CPC assemelha-se em tudo à obtenção de um cimento Portland. Junta-se o pó com o líquido e mistura-se manualmente. É obtida uma pasta plástica que endurece e este processo pode demorar segundos, minutos ou horas dependendo do líquido de presa usado. O tempo do processo de endurecimento até se obter um cimento em bloco, designa-se *setting time* ou tempo de presa.<sup>13,61</sup> Os cimentos de  $\beta$ -TCP/MCPM, conhecidos como cimentos de bruchite têm uma reação de endurecimento praticamente instantânea quando o líquido de presa usado é apenas água.<sup>61</sup>

Para que os cimentos tenham uso clínico, estes devem ter algumas propriedades como um tempo de mistura curto - aproximadamente 1 minuto -,

tempo de endurecimento nem demasiado curto nem elevado (deve permitir a sua manipulação sem que este interfira com a aplicação clínica), e ser manipulável sem que a sua resistência mecânica seja afetada.<sup>61,62</sup>

Os processos de presa dos cimentos de fosfatos de cálcio baseiam-se em dois tipos de reações: uma reação ácido-base ou uma reação de hidrólise.<sup>60</sup> Neste trabalho, os cimentos bruchíticos (DCPD-CPC) serão obtidos por uma reação ácido-base entre o  $\beta$ -TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) com o fosfato monocálcico monohidratado ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , MCPM, ácido), como se apresenta na equação 2.<sup>13</sup>



A fonte ácida pode ser proveniente de outros reagentes, como o ácido fosfórico ou o fosfato monocálcico anidro (MCPA), embora para o presente trabalho seja usado o sistema  $\beta$ -TCP/MCPM.

O líquido, que pode ser água, soluções aquosas com vários sais aceleradores ou retardadores de presa, é o ligante e apresenta grande importância na cinética da presa, para a formação da microestrutura e para as propriedades mecânicas.

Os CPCs oferecem várias vantagens apazíveis, sendo uma delas a baixa temperatura da reação, o que permite uma aplicação sem existir a possibilidade de necrose dos tecidos circundantes.<sup>60,61</sup> Também segundo Torres *et al.* (2015)<sup>9</sup>, estes cimentos são biocompatíveis, reabsorvíveis e osteocondutores. O grau de degradação destes é um fator importante de avaliação da bioatividade destes materiais. Os CPCs rapidamente absorvidos, como os DCPD-CPC, são digeridos por macrófagos e células gigantes. Ao contrário, os CPCs como o HA-CPC são absorvidos lentamente e são digeridos por células tipo-osteoclastos.<sup>63</sup> A reabsorção dos cimentos depende das propriedades físico-químicas do material: composição, cristalinidade, porosidade, densidade, forma, tamanho, não excluindo o local de aplicação.<sup>63</sup>

Todas estas características fazem dos cimentos ósseos materiais promissores a aplicações biomédicas e o facto de serem injetáveis torna-os mais versáteis quando comparados com outros materiais de preenchimento ósseo como os grânulos ou os blocos de CaPs.<sup>13</sup>

### 1.3.1. Propriedades dos CPCs

Para que os CPC sejam adequados à aplicação clínica devem ser portadores de algumas propriedades como tempos de presa adequados, serem injetáveis, propriedades mecânicas semelhantes às do osso e com uma taxa de reabsorção que acompanhe a taxa de formação de novo osso.<sup>13,48,64</sup>

#### *Tempo de presa e endurecimento*

Existem dois métodos estandardizados para avaliação do tempo de presa: (i) método da agulha de *Vicat* (ASTM C191-92) e (ii) método das agulhas de *Gillmore* (ASTM C266-89).<sup>13</sup> No primeiro método, o tempo de presa é avaliado por uma agulha fina que é colocada na superfície do cimento até este suportar o seu peso sem deixar marca. No método das agulhas de *Gillmore* medem-se dois tempos de presa – o inicial (IST – *initial setting time*) que é medido por uma agulha larga e leve, e o final (FST – *final setting time*) medido por uma agulha fina e pesada.<sup>45</sup> O IST é o tempo a partir do qual o cimento deixa de poder ser manuseado sem que ocorram danos na sua estrutura e o FST é o tempo a partir do qual o cimento fica endurecido.<sup>45</sup> Estes dois tempos apresentam um significado clínico, isto é, a pasta não deve ser implantada antes do tempo inicial e a ferida só pode ser fechada após o tempo final e o cimento não deve ser deformado entre ambos para que não ocorram possíveis fissuras durante o processo de presa do mesmo.<sup>13,65</sup> Segundo Driessens et al.<sup>66</sup>, foram formulados os seguintes requisitos de manuseamento (em minutos) que se podem ver também na Figura 10:

$$3 \leq \text{IST} < 8 \quad (3)$$

$$\text{FST} \leq 15 \quad (4)$$

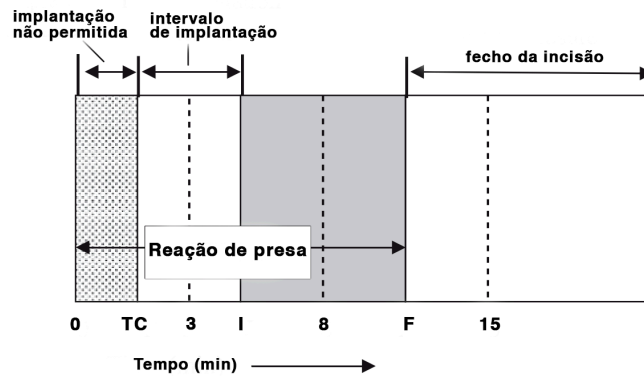


Figura 10 - Diagrama dos parâmetros de presa relevantes para um CPC: TC - tempo de coesão; I - tempo de presa inicial (IST); F - tempo de presa final (FST) (adaptado de <sup>66</sup>).

O tempo de coesão é o tempo a partir do qual o CPC deixa de se desintegrar quando em contacto com um fluido.<sup>45</sup> O  $IST - TC \geq 1 \text{ min}$  (intervalo de implantação), que significa que o tempo de coesão deve ser pelo menos 1 minuto antes do tempo inicial para que seja possível aplicar e moldar o material.<sup>13</sup>

Os CPCs de bruchite têm tendência a prender muito rápido, sendo que este tempo é controlado pela solubilidade da fase mais básica do precursor do cimento – quanto mais solúvel for mais rápida é a presa. Para aumentar o tempo de presa usam-se retardadores na fase líquida, como polímeros que acabam também por melhorar a coesão das pastas de CPC.<sup>45</sup>

### *Injetabilidade*

A viscosidade da pasta cimentícia pode variar consoante o método de aplicação usado. Se for aplicado com uma espátula ou com os dedos, a pasta deve ser altamente viscosa. Caso a aplicação seja com a seringa (a mais comum) é necessária uma pasta com uma viscosidade mais baixa para que esta possa ser injetada.<sup>13,67</sup>

A injetabilidade das pastas cimentícias é uma propriedade crucial para procedimentos cirúrgicos como vertebroplastia e cifoplastia ou para a colocação do cimento num espaço estreito, como na reparação do osso periodontal.<sup>8,14</sup> Esta característica é muito importante, uma vez que minimiza a invasão cirúrgica e permite que defeitos com aspetos complexos sejam preenchidos de forma adequada.<sup>45</sup>

Os CPCs apresentam, por norma, fracas propriedades de injetabilidade. Todos os cimentos de fosfatos de cálcio são moldáveis, mas nem todos são injetáveis e isto prende-se com alguns fatores como o tamanho de partícula e o seu formato, a distribuição do tamanho de partícula, a razão líquido/pó e a viscosidade do líquido.<sup>8,68</sup> As propriedades reológicas da pasta também influenciam a injetabilidade, pois os CPCs têm propriedades reológicas transientes ao longo da reação de presa, que começam desde que se mistura o líquido com o pó.<sup>45</sup> É devido a estes fatores que esta propriedade tem sido bastante investigada e há uma necessidade de a definir.<sup>68,69</sup>

A injetabilidade de uma pasta de CPC é definida como a capacidade de ser injetada através de uma seringa de forma homogénea - sem que haja separação da fase sólida e da fase líquida – sob uma força aplicada.<sup>13,45,68-69</sup> A Figura 11 mostra uma representação esquemática do sistema de avaliação da injetabilidade dos CPCs.

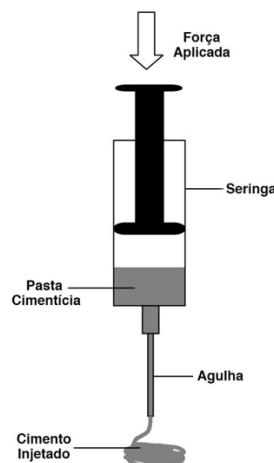


Figura 11 - Representação esquemática do sistema de avaliação da injetabilidade dos CPCs (adaptado de <sup>14</sup>).

Para avaliar a percentagem de pasta extrudida, tem-se como parâmetros base deste sistema: uma agulha de 2 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento e uma carga constante de 100 N.<sup>13,68</sup> No entanto, durante a extrusão pode ocorrer uma separação de fases líquida e sólida, denominada frequentemente como *filter pressing effect*, sendo primeiramente extrudida uma fração mais líquida da pasta, ficando retida na seringa a fração mais sólida.<sup>14,45,62,68</sup> Bohner e Baround<sup>68</sup> estudaram este parâmetro e relacionaram o efeito de *filter-pressing* com a fraca



injetabilidade, caracterizando o fenômeno com uma razão líquido/pó mais elevada na porção de pasta extrudida relativamente à mistura inicial.<sup>14,65</sup> Esta heterogeneidade da pasta tende a aumentar a força requerida para a extrusão podendo levar à obstrução da agulha.<sup>14,62</sup> Devido a esta separação de fases não é possível saber ao certo se o comportamento da pasta extrudida a nível de tempos de presa (TP), de propriedades mecânicas e biológicas é clinicamente aceitável.<sup>65</sup> Também deve ser considerado outro problema durante a injetabilidade da pasta, como o seu endurecimento prematuro dentro da seringa. Um aumento de temperatura no material acelera o processo de presa – basta ter a mão na seringa durante o enchimento para aumentar a temperatura e mudar as propriedades de presa do CPC.<sup>62</sup>

A viscosidade é um fator importante para a injetabilidade.<sup>48</sup> Existem algumas formas de modificar e adequar a viscosidade das pastas como: (i) RLP; (ii) tamanho de partícula do pó; (iii) uso de aditivos iónicos e/ou não-iónicos. Por exemplo, o uso de ácido cítrico e citrato de sódio como aditivos iónicos tornam a carga da superfície das partículas dos CaPs mais negativa, atuando como um dispersante da pasta e agente liquidificante.<sup>13,45</sup>

### *Propriedades mecânicas*

Os cimentos à base de fosfatos de cálcio comercialmente disponíveis não apresentam um bom desempenho mecânico para aplicações que estejam sujeitas a elevadas tensões mecânicas. Portanto, há necessidade de expandir a sua gama de aplicação, como por exemplo ao tratamento de fraturas por compressão de vértebras osteoporóticas em que o osso está sujeito a cargas maiores.<sup>1,14,48</sup> Para este caso, propriedades físicas como a resistência à compressão (RC) e resistência à tração (ou resistência à tração diametral – RTD) dos materiais são importantes e devem ter valores na ordem dos valores máximos do osso trabecular (Tabela 1).<sup>14,45</sup>

Os CPCs são materiais frágeis, pelo que o ensaio mecânico que é mais comum para a avaliação das propriedades mecânicas destes é a resistência à compressão. Por definição, esta é a tensão máxima (em MPa) que uma amostra com uma determinada área de secção transversal consegue suportar antes da rutura. Para fazer este ensaio, os cimentos devem ter uma geometria cilíndrica com diâmetro

de 6 mm e altura 12 mm e a força aplicada pela máquina é feita na base superior do cilindro, como mostrado na Figura 12, de acordo com a norma ASTM F 451- 0891 para cimentos ósseos acrílicos.<sup>14</sup>

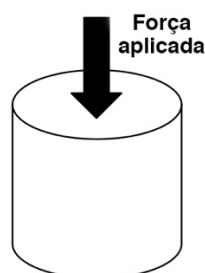


Figura 12 - Representação esquemática das amostras para os ensaios mecânicos de compressão (adaptado de <sup>48</sup>).

A resistência à tração diametral é medida de forma semelhante à RC: as amostras em forma de cilindro são colocadas na horizontal e as forças de tração são induzidas na perpendicular à carga aplicada. A amostra deve ter 6 mm de diâmetro e 3 mm de altura.<sup>14</sup>

Fatores que influenciam a injetabilidade também influenciam as propriedades mecânicas, como é o caso da RLP, o tamanho de partícula, o uso de aditivos, a proporção e natureza das fases formadas. A adição de agentes retardadores permite uma densificação da pasta e, com isto, um aumento da força compressiva em condições a húmido.<sup>14,45</sup>

#### *Biocompatibilidade e bioreabsorção*

Um substituto ósseo deve ter uma velocidade de degradação proporcional ao crescimento de novo osso, de forma a garantir o suporte mecânico durante todo o processo de regeneração óssea. Novos conceitos como a biodegradação, bioreabsorção ou osteocondução aparecem nesta área e desafiam o desenvolvimento de biomateriais capazes de serem colonizados por células que o degradam e o substituem por novo tecido ósseo.<sup>10,24</sup> Existem vários estudos na literatura dedicados à caracterização *in vivo* do comportamento dos CPCs e mostram que estes biomateriais são altamente biocompatíveis e osteocondutores, ou seja, que podem estimular a regeneração de novo tecido.<sup>18,45</sup>

A biocompatibilidade é a habilidade do material não causar dano, reações tóxicas ou imunológicas aos tecidos vivos.<sup>14,18</sup> A resorção ou bioreabsorção é o

termo usado para descrever materiais que desaparecerão do local de implantação com o tempo, independentemente do mecanismo que leva à degradação do material. Existem dois mecanismos possíveis na reabsorção dos CaPs: (i) reabsorção ativa – que é mediada pela atividade celular dos osteoclastos e que é comum para CPCs rapidamente reabsorvidos como os de bruchite; (ii) reabsorção passiva – é feita pela dissolução ou hidrólise química nos fluidos do organismo, também exercida para CPCs bruchíticos.<sup>10,18</sup>

Os cimentos de bruchite são reabsorvidos mais rapidamente que cimentos apatíticos devido ao facto da bruchite ser metastável em condições fisiológicas, sendo o CaP degradável por excelência.<sup>24,45</sup> A taxa de biodegradação dos materiais à base de CaPs aumenta com diversos fatores como o aumento da área de superfície, a diminuição da cristalinidade do cristal (mais amorfo), diminuição do tamanho de grão e também a substituição iónica, sendo assim possível controlar a velocidade de degradação do material de acordo com a sua aplicação.<sup>14</sup>

#### **1.4. Aplicações biomédicas**

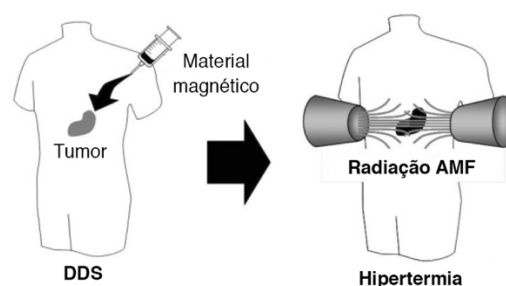
Os CPCs apresentam grande aplicabilidade em diversas áreas, pois são bioativos, biocompatíveis, osteocondutivos, moldáveis e não são tóxicos. A sua cura, ou reação de endurecimento, não apresenta uma reação exotérmica de alta temperatura, o que preserva os tecidos que rodeiam o local onde são aplicados, mas as suas fracas propriedades mecânicas limitam o campo de aplicações.<sup>13,70</sup>

As utilizações dos CPCs passam por: (i) aplicação dentária – endodontia, no preenchimento do canal do dente e/ou no preenchimento de lesões nos maxilares; (ii) aplicações maxilofacial e craniofacial; (iii) aplicações ortopédicas – tratamento de fraturas, cimentação de próteses; (iv) em sistema de entrega de fármacos - como antibióticos, fármacos anticancerígenos, hormonas, anti-inflamatórios; (v) vertebroplastia e cifoplastia – preenchimento de fraturas osteoporóticas por compressão na coluna vertebral.<sup>13</sup>

#### **1.5. Hipertermia e materiais já utilizados para esta aplicação**

A hipertermia é um tratamento médico já utilizado no qual as células cancerígenas são destruídas pelo aumento de temperatura. Ainda não existe um

consenso específico do intervalo de temperaturas mais eficazes, mas estima-se que seja entre os 39°C e os 46°C, podendo variar consoante o tratamento. A hipertermia pode ser de corpo inteiro (hipertermia de corpo inteiro), de uma parte do corpo (hipertermia regional) ou de um tecido (hipertermia local) e, seja qual for o local, a aplicação da temperatura desejada deve ser feita sem causar danos nos tecidos normais circundantes. Ainda assim, existem algumas dificuldades em aquecer o local do tumor até à temperatura pretendida sem danificar os tecidos saudáveis. É por isso necessário encontrar soluções e novos sistemas de hipertermia capazes de atuar especificamente no tecido tumoral alvo.<sup>71</sup>



**Figura 13 - Esquema do tratamento por hipertermia; O biomaterial magnético é colocado no local do tecido tumoral por um sistema de entrega de fármaco (DDS), seguindo-se de uma irradiação com um campo magnético alternado (AMF) produzido no exterior do corpo, resultando numa hipertermia intracelular específica (adaptado de <sup>71</sup>).**

A terapia magnetotérmica é considerada uma alternativa promissora no tratamento de doenças ósseas cancerígenas. Segundo alguns estudos<sup>72,73</sup>, os campos magnéticos estimulam a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, promovem a expressão de fatores de crescimento e, conseqüentemente, aumentam a osteointegração e aceleram a formação do novo osso. Adicionalmente, a aplicação de um campo magnético alternado (AMF) externo induz a geração de calor através do biomaterial magnético, proporcionando uma atuação específica e controlada no alvo, prevenindo a destruição de tecidos circundantes.

As células malignas apresentam uma baixa tolerância ao calor quando comparadas com células saudáveis. Esta tolerância reduzida motiva o uso da hipertermia magnética como um tratamento, em paralelo com as outras terapias cancerígenas. O aquecimento pode ocorrer por três mecanismos: (1) aquecimento por correntes devido a efeitos de indução pela aplicação do AMF; (2) aquecimento

por fricção induzido pela interação entre o biomaterial magnético e o meio circundante e (3) relaxação e perda histerética do biomaterial magnético. Para que a hipertermia ocorra é essencial que exista dissipação de energia para converter a energia magnética em calor.<sup>74-76</sup>

Já existem alguns biomateriais magnéticos utilizados para esta finalidade, bem como para aplicações na área da oftalmologia, ortodontia, cardiologia, gastroenterologia e neurologia. Destacam-se as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs), bem como o fabrico de *scaffolds* incorporando estas nanopartículas.

### **1.5.1. Nanopartículas magnéticas (MNPs)**

O estudo de nanopartículas magnéticas (MNPs) tem tido um elevado foco por parte da comunidade científica, pois estes biomateriais exibem propriedades magnéticas únicas, muito atraentes no ramo da biomedicina.<sup>77</sup> O tratamento por hipertermia combinando a aplicação de um campo magnético alternado e partículas magnéticas como agentes indutores de aquecimento foi reportado pela primeira vez nos anos 80.<sup>72,78,79</sup>

As MNPs com tamanhos abaixo de 20 nm apresentam um comportamento pseudo-paramagnético, designado superparamagnetismo. Esta capacidade é dada pela perda de magnetização após a retirada do campo magnético, prevenindo assim a agregação adversa das MNPs e possibilitando a rápida dispersão das mesmas. É também possível conduzir as MNPs através de campos magnéticos exteriores para o local alvo, com diversas funções, sendo a mais comum o transporte de fármacos.<sup>71,77,78</sup>

As SPIONs biocompatíveis, como as MNPs de magnetite e de *maghemite* - óxidos ferro- e ferrimagnéticos -, são muito usadas em aplicações biomédicas *in vivo*, incluindo como contraste de ressonância magnética (MRI), entrega de fármaco em tecidos específicos, hipertermia e terapia radionuclear assistida por campo magnético.<sup>71</sup> Estas nanopartículas são estáveis em água a pH neutro e na salinidade fisiológica, fatores importantes para a sua aplicação. Além de poderem ser guiadas e controladas até ao local de aplicação desejado por métodos minimamente invasivos, possuem a capacidade de aquecimento por indução

magnética. NPs deste tipo de óxidos de ferro são utilizadas para interagir especificamente por indução magnética por AMF.<sup>71,77</sup>

Embora recentes e não muito explorados, existem também na literatura alguns estudos relativos ao desenvolvimento de nanopartículas magnéticas de Hidroxiapatite dopada com íons ferro. Além das boas propriedades biológicas que a HA apresenta, quando dopada com íons divalentes e trivalentes mostra taxas mais elevadas de adesão osteoblástica em comparação com uma HA não dopada.<sup>80</sup> A dopagem de NPs de HA com ferro é vantajosa pois transporta as propriedades ferromagnéticas desse íon para a hidroxiapatite, tornando-a como mediadora de calor no tratamento de cancro por hipertermia.

### **1.5.2. Scaffolds magnéticos**

A incorporação de MNPs em *scaffolds* para regeneração de tecidos tem sido um objeto de estudo recente. Segundo A. Ortolani et al.<sup>78</sup>, através da aplicação de um campo magnético externo (AMF ou SMF – campo magnético alternado ou estático, respetivamente), os *scaffolds* superparamagnéticos podem ser ativados pela indução de um campo magnético estático, causando um deslocamento das partículas ao longo do vetor gradiente. Por sua vez, cria forças de compressão e de tensão na membrana celular, deformando conseqüentemente o citoesqueleto e ajudando na proliferação celular. Assim, é possível mimetizar os efeitos de carga mecânica e regular as funções osteoblástica e osteoclástica para a formação de novo tecido ósseo. Isto deve-se à incorporação de MNPs nos *scaffolds*, pois estas influenciam a rugosidade da superfície, a rigidez e as propriedades elásticas destes biomateriais e têm grande influência na adesão celular. Foi concluído que os *scaffolds* magnéticos têm influência na adesão, proliferação e diferenciação celular.<sup>77</sup>

## **Capítulo 2 - Obtenção e caracterização de pós de fosfatos de cálcio não dopados e dopados com ferro**





## 2.1. Enquadramento teórico

Como foi já mencionado, a colocação de um substituto ósseo com resposta magnética num defeito ósseo pode acelerar o processo de osteogénese quando submetido a um campo magnético externo.<sup>81</sup> Por outro lado, se esse mesmo substituto apresentar propriedades magnetotérmicas, pode induzir a apoptose de células tumorais remanescentes em caso de defeitos criados pela remoção de uma massa tumoral óssea.<sup>71</sup> Na tentativa de obter materiais sensíveis a um campo magnético, são apresentados alguns resultados na literatura para diferentes aplicações. Grande parte destes trabalhos passa pelo desenvolvimento de nanopartículas magnéticas e/ou a sua incorporação em substitutos ósseos. Embora estas nanopartículas tenham bons desempenhos, a sua toxicidade a longo prazo ainda não é conhecida, facto que as torna menos atrativas. A dopagem de pós à base de fosfatos de cálcio com iões ferro surge como uma alternativa. Além de ser um ião que pode trazer propriedades magnéticas aos pós, o Ferro é essencial para a proliferação e sobrevivência das células eucariotas. A importância biológica deste metal de transição deve-se às suas propriedades químicas (a maior parte do ferro intracelular encontra-se no estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), no entanto, durante os processos intracelulares é reduzido ao seu estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ )).<sup>82</sup>

Ram Kishore Singh et al.<sup>16</sup> focaram-se na obtenção e caracterização de pós de  $\beta$ -TCP dopado com ferro. Para a síntese dos pós, os autores usaram como precursores  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , mostrando as caracterizações dos pós obtidos com 5 concentrações diferentes de ferro, num intervalo entre 2,5 mol.% e 12,55 mol.%. A síntese dos pós foi realizada pelo método de precipitação química em meio aquoso, com uma razão  $(\text{Ca}+\text{Fe})/\text{P}$  de 1,5 a pH perto de 8. Os autores mostraram o aparecimento de duas fases cristalinas,  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  e  $\text{CaFe}_3(\text{PO}_4)_3\text{O}$ , para os pós obtidos com concentrações de ferro acima de 5,02 mol.%. A fase  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  foi identificada como sendo a responsável pela resposta magnética e hipertérmica dos pós obtidos, sendo o pó com 7,54 mol.% de ferro o que apresentou a melhor resposta magnética e hipertérmica.

Anna Tampieri et al.<sup>17</sup> obtiveram pós de HA dopados com ferro, usando 3 métodos de síntese diferentes, onde utilizaram como precursores uma solução de

ácido fosfórico (85 wt.% pura, 44,40g em H<sub>2</sub>O), Ca(OH)<sub>2</sub> e uma fonte ferro que variou consoante o método de síntese. Num método foi usado o FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, noutro o FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, e por último uma mistura de ambos, de forma a estudar a influência dos iões Fe<sup>2+</sup> ou Fe<sup>3+</sup> nas propriedades dos pós obtidos. Os autores concluem que o cálcio na rede cristalina da HA é parcialmente substituído por Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, em que a adição simultânea de ambas as espécies indicou uma razão (Ca+Fe)/P perto do valor teórico (1,67). Um dos pós obtidos destacou-se pelo seu comportamento superparamagnético, com um efeito hipertérmico que confirmou o magnetismo intrínseco dos pós Fe-HA. Ainda destacam que as propriedades magnéticas em conjunto com a biocompatibilidade abrem portas para a medicina regenerativa, em que é possível ativar e manipular os substitutos biomiméticos para novas terapias anticancerígenas. Um estudo realizado por Sahar Vahabzadeh e Susmita Bose<sup>83</sup> mostrou também que a incorporação de ferro nos fosfatos de cálcio ajuda na proliferação e diferenciação celular, acelerando o processo de regeneração óssea.

Estes estudos já existentes na literatura mostram que, à semelhança do comportamento de nanopartículas magnéticas, os fosfatos de cálcio dopados com iões magnéticos apresentam-se promissores para aplicação em tratamento por hipertemia.<sup>72,78,79</sup>

O primeiro objetivo deste trabalho consistiu em obter pós multifuncionais à base de fosfatos de cálcio dopados com iões ferro, ou seja, capacidade de regeneração óssea e propriedades hipertérmicas. Tendo por base estudos existentes na literatura<sup>16,17</sup>, foram testados diferentes parâmetros, tais como teor de ião ferro, estado de oxidação do precursor inicial de ião Fe (Fe<sup>2+</sup> ou Fe<sup>3+</sup>) e temperatura de calcinação.

## **2.2. Procedimento experimental**

### **2.2.1. Preparação de pós de fosfatos de cálcio não dopados e dopados com ferro**

Para o desenvolvimento deste trabalho foram sintetizados e caracterizados pós de fosfato tricálcico (Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, TCP) dopados com várias concentrações molares de Fe<sup>2+</sup> (0, 3, 7 e 10 mol.%) e Fe<sup>3+</sup> (7 e 10 mol.%). Os pós foram sintetizados em laboratório pelo método de precipitação química em meio aquoso, baseando-se no

procedimento estabelecido por trabalhos anteriores.<sup>14,57,58</sup> Como precursores químicos de cálcio e fósforo, foram usados nitrato de cálcio tetra hidratado [Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, PanReac AppliChem, Barcelona, Espanha] e di-hidrogenofosfato de amónia [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, PanReac AppliChem, Barcelona, Espanha] respetivamente. Como fonte de iões Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> foram utilizados cloreto de ferro (II) [FeCl<sub>2</sub>, HoneyWell, Alemanha] e nitrato de ferro (III) [Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich, Alemanha], respetivamente. A razão molar (Ca+Fe)/P foi de 1,53 para todas as composições, por forma a ser possível baixar o pH da síntese sem que ocorresse o aparecimento de pirofosfato de cálcio (CPP). À semelhança de trabalhos anteriores<sup>14</sup> com a dopagem de β-TCP com iões Mn<sup>2+</sup>, o pH estabelecido para este trabalho foi de 6,5 de modo a reduzir a oxidação espontânea dos iões Fe<sup>2+</sup> em Fe<sup>3+</sup> que ocorre em meio aquoso. O ião ferro em ambos os estados de oxidação é estável em condições de ambiente ácido e precipita na forma Fe(OH)<sub>2</sub> em ambiente alcalino que, posteriormente, oxida formando FeO(OH).<sup>14,84</sup>

Todas as sínteses dos pós foram feitas sob as mesmas condições: a uma temperatura de 30°C com duração total de 3 h em constante agitação (600 rpm) e com um pH experimental que oscilou entre 6-6,5, ajustado ao longo da síntese com adição de amónia [NH<sub>4</sub>OH, PanReac AppliChem, Barcelona, Espanha]. O precipitado resultante foi filtrado sob vácuo, permitindo assim retirar o excesso de água. Depois de seco numa estufa a 110°C durante cerca de 24 h e, antes de ser calcinado, o precipitado foi sujeito a uma pré-moagem de 1 minuto de modo a quebrar os aglomerados resultantes da secagem.

Todos os pós obtidos foram calcinados a 1000°C num forno Thermolab (Termopar-Pt30%Rh/Pt6%Rh) com uma taxa de aquecimento de 5°C·min<sup>-1</sup> e com um patamar de 5 h à temperatura máxima, seguido de arrefecimento natural até à temperatura ambiente. Posteriormente, parte dos pós dopados com 7 mol.% de Fe<sup>2+</sup> e 7 mol.% Fe<sup>3+</sup> sofreram uma segunda calcinação a 1100°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C·min<sup>-1</sup> até 1000°C, seguido de uma taxa de aquecimento de 5°C·min<sup>-1</sup> até 1100°C e com um patamar de 5 h a essa temperatura, e arrefecimento natural até à temperatura ambiente. Após a calcinação, os pós foram passados numa rede de 40 μm para posterior caracterização.

A Tabela 3 apresenta as condições de síntese para cada pó e a respetiva nomenclatura.

**Tabela 3 - Nomenclatura atribuída aos pós de TCP dopados com ferro, onde “y” corresponde ao estado de oxidação do ião ferro, Fe<sup>2+</sup> ou Fe<sup>3+</sup>, do reagente precursor e “xxxx” corresponde à temperatura de calcinação (1000°C ou 1100°C).**

Código de Ref.	Composições		
	Razão Ca/P	Razão (Ca+Fe)/P	Conc. mol.% Fe
TCP0Fe - xxxx	1,53	-	0
TCP3Fe <sup>y</sup> - xxxx	1,484	1,53	3
TCP7Fe <sup>y</sup> - xxxx	1,449	1,53	7
TCP10Fe <sup>y</sup> - xxxx	1,377	1,53	10

### 2.2.2. Caracterização de pós de fosfatos de cálcio não dopados e dopados com ferro

#### Difração de raios-X e análise quantitativa de fases – refinamento de Rietveld

A análise qualitativa das fases cristalinas foi feita por difração de raios-X (DRX) usando um difratómetro de alta resolução (Malvern PANalytical X'Pert, Worcestershire, Reino Unido) com uma radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda=1,540598$  Å) e com monocromador de Ni para redução da fluorescência proveniente dos iões de ferro. Os dados foram adquiridos num intervalo de varrimento ( $2\theta$ ) de 4 a 70° com uma largura de passo de 0,0131°  $2\theta \cdot s^{-1}$ . Para a realização desta análise, amostras bem secas de todos os pós tratados termicamente foram finamente moídas num almofariz de ágata, de modo a obter uma amostra representativa de cada pó a ser testado, e passados num peneiro de 40  $\mu m$ . A identificação das fases cristalinas foi efetuada por comparação entre o difratograma obtido com os difratogramas padrão das respetivas fases cristalinas detetadas, recorrendo ao software associado ao equipamento.

A análise quantitativa das fases cristalinas foi obtida pelo método de refinamento de Rietveld (TOPAS versão 4.2, Bruker AXS, Karlsruhe, Alemanha). Os números ICDD utilizados para a análise dos pós foram: #04-006-9376 para o  $\beta$ -TCP, #04-009-3876 para o CPP, #04-008-4393 para  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  e #04-007-9266 para a  $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

#### Distribuição do tamanho de partícula e área superficial específica

A distribuição do tamanho de partícula dos pós foi medida pelo método de *laser scattering* (Coulter LS230, Buckinghamshire, Reino Unido, Fraunhofer optical model). Antes da medição e a fim de obter uma distribuição representativa do tamanho de partícula, uma pequena quantidade de cada amostra foi dispersa em água por forma a obter uma suspensão bastante diluída, com a adição de 1-2 gotas de desfloculante (Targon 1128) e colocada num banho de ultrassons durante 5 minutos à temperatura ambiente para melhorar a dispersão.

A área superficial específica (SSA) foi obtida pelo método BET (Brunauer-Emmett-Teller), com recurso ao aparelho Micromeritics Gemini 2370 V5.00 (Norcross, EUA), através da medida de adsorção de gás após a degaseificação dos pós durante a noite à temperatura de 200°C num Micromeritics Flow Prep 060 (Norcross, EUA).

#### Espetroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro infravermelho foi obtido por Espetroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR Bruker Tensor 27, Massachusetts, EUA). Cada pó foi misturado com KBr numa proporção de 1/150 (em peso) durante 15 minutos e prensado numa pastilha. Em cada espectro foram coletados 128 varrimentos com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  no modo de transmitância à temperatura ambiente. Esta técnica permite identificar os diferentes grupos químicos constituintes de um material, tendo por base a vibração das suas ligações químicas.<sup>85</sup>

#### Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

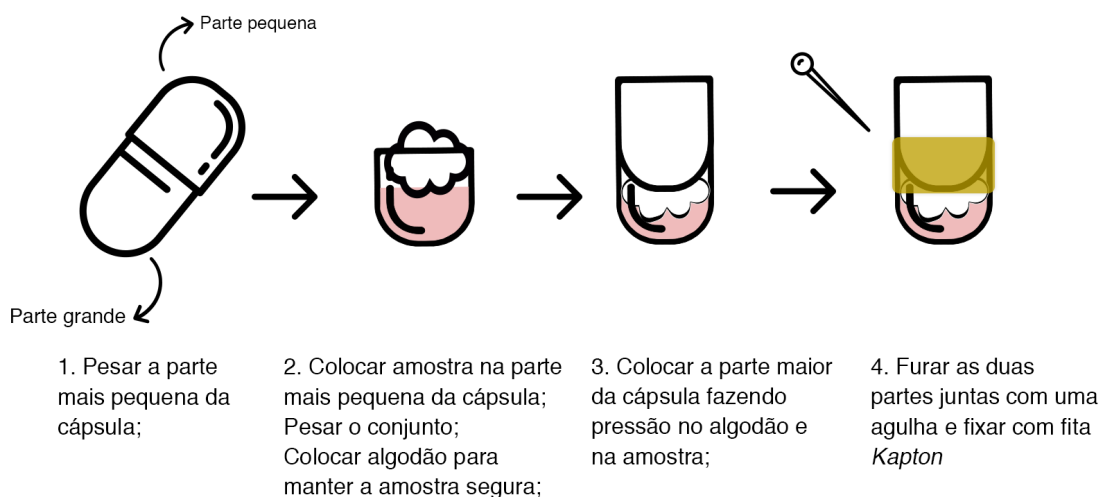
A morfologia e microestrutura dos vários pós calcinados foi avaliada por Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM, Hitachi S-4100, Tóquio, Japão), bem

como o mapeamento químico por EDS, com uma aceleração de 25 kV e diferentes resoluções (x400, x1K, x10K).

Para a preparação das amostras, uma pequena quantidade de cada pó foi dispersa em etanol e uma gota de cada suspensão foi colocada sobre uma lamela de vidro fixa no porta-amostras de alumínio com cola de carbono. Para o mapeamento químico por EDS foram feitas pastilhas prensadas durante 30s com 1000Kg e colocadas no porta-amostras fixas com cola de carbono. Após preparação, as amostras foram colocadas numa estufa a 40°C durante 24 horas, tendo-se feito a deposição de um filme de carbono (Carbon Evaporator K950, Emitech, França) antes da análise microscópica das amostras.

#### Medição da magnetização (SQUID) e de capacidade hipertérmica

A preparação das amostras está representada na Figura 14. As medidas foram realizadas num dispositivo supercondutor de interferência quântica, num magnetómetro SQUID MPMS 3, variando o campo magnético no intervalo [- 40000, 40000] Oe, à temperatura ambiente (300 K). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, usando em média 45 mg de amostra para cada medida.



**Figura 14 - Esquema do procedimento para a preparação de amostras para as medidas de magnetização.**

### Avaliação da viabilidade celular (*in vitro*)

#### *Linha celular MC3T3*

A linha celular utilizada para realizar os ensaios preliminares de viabilidade foi a linha de pré-osteoblastos MC3T3-E1 (ATCC CRL-2593). Esta foi mantida a 37°C em atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub> em ar, em *Minimum Essential  $\alpha$ -Medium* com 2 mM de Glutamina em EBSS (*Eagle Balanced Salt Solution*) suplementada com 10% (v/v) de soro fetal de bovino (FBS), 1% (v/v) de 100 U·mL<sup>-1</sup> de uma solução de penicilina e 100 mg·mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (Gibco BRL, Invitrogen), e 3,7 g·L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>. As sub-culturas confluentes (a 80-90% de confluência) foram divididas (1:5) usando uma solução de 0,05% tripsina/EDTA (Gibco BRL, Invitrogen) a 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### *Viabilidade e proliferação (ensaio da resazurina).*

O ensaio de resazurina permite ver o efeito dos pós de fosfatos de cálcio dopados com ferro no metabolismo e proliferação celular.<sup>14</sup> A resazurina é um corante azul que é internalizado pelas células e metabolicamente reduzido a resorufina, resultando em mudanças de cor (para rosa) e fluorescência mediante a atividade metabólica celular.<sup>86</sup>

Células MC3T3 foram semeadas a 1x10<sup>4</sup> células·cm<sup>-2</sup> (100,000 células por poço) em placas de 6 poços. Foram efetuadas quatro réplicas biológicas. As células controlo foram mantidas em meio completo sem adição de pós. Nas restantes condições, os pós foram adicionados sobre as células no fundo do poço, na forma de uma suspensão de 1 mg·mL<sup>-1</sup> em meio celular. Foi sempre assegurada uma boa dispersão do pó no meio antes da sua aplicação. Para realizar os ensaios de metabolismo celular, os pós a serem caracterizados foram esterilizados em autoclave a uma temperatura de 121°C durante 30 minutos, e as amostras de pó pesadas em tubos esterilizados.

As células foram incubadas a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>. Nos dias de cultura 1, 3 e 7, o meio celular foi substituído com novo meio com 10% de solução de resazurina (0,1 mg·mL<sup>-1</sup> em PBS) e incubado durante 4h. Após a incubação, o meio foi recolhido e a absorvância medida espectralmente a 570 e 600 nm. Nos cálculos finais, foi determinada a razão O.D. 570/600 e retirada a razão das O.D.s

dos 'brancos'. Como 'brancos' foram usados pós a uma mesma concentração, incubados com resazurina em paralelo com as amostras, mas na ausência de células. Os resultados foram apresentados sob a forma de variação sobre os valores das células controlo ao dia 1 de cultura (tomadas como 1).

#### *Ensaio da ALP (fosfatase alcalina)*

Ao dia 7 foi recolhido meio de cultura celular de cada poço para realizar o ensaio de ALP. A fosfatase alcalina faz parte das membranas citoplasmáticas dos osteoblastos ativos, e tem uma função bastante importante no processo de mineralização óssea.<sup>87</sup> Para este ensaio, foram colocados 40  $\mu$ L do meio de cada amostra (em três réplicas técnicas) numa placa de 96 poços, e foram adicionados 200  $\mu$ L de substrato de ALP a cada poço. Nas amostras controlo foram colocados 240  $\mu$ L de substrato de ALP sozinho. Incubou-se a placa de 96 poços durante 1h a 37°C fora do alcance da luz (protegido com folha de alumínio) e, de seguida, foram adicionados 10  $\mu$ L de solução de NaOH a 0,02 M a cada poço, para parar a reação e com o intuito de ajudar no desenvolvimento da reação colorimétrica. No final da reação, a absorvância foi lida a 405 nm, a média das réplicas técnicas determinada, assim como a média das quatro réplicas biológicas. Os resultados foram apresentados sob a forma de variação sobre os valores das células controlo (tomadas como 100%).



## 2.3. Resultados e discussão

### 2.3.1. Caracterização estrutural e morfológica dos pós de $\beta$ -TCP dopados com ferro

#### 2.3.1.1. Efeito do aumento do teor de ferro

Na Figura 15 são apresentados os difratogramas dos pós de TCP-Fe com diferentes teores de ferro – (a)  $2\theta$  entre  $20^\circ$  e  $45^\circ$ , (b) ampliação do difratograma apresentado em (a) na gama  $2\theta$  entre  $25-30^\circ$  e (c) ampliação do difratograma (a) entre  $2\theta = 30-35^\circ$  para mostrar o efeito da incorporação do Fe no deslocamento dos picos de DRX. Para identificação das respectivas fases cristalinas presentes recorreu-se às fichas PDF *standard*:  $\beta$ -TCP, CPP,  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  e  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da análise quantitativa das fases cristalinas presentes nos pós, obtidos pelo método de refinamento de Rietveld.

Pela análise da Figura 15 e da Tabela 4 é possível verificar que a fase  $\beta$ -TCP está presente em todos os pós TCP-Fe, em quantidades bastante superiores nos pós não dopados e dopados com 3 mol.%  $\text{Fe}^{2+}$ , diminuindo significativamente nos pós com teores de ferro superiores (7 e 10 mol.%). O TCP0Fe, como seria de esperar, tem como fase maioritária  $\beta$ -TCP puro, fortemente alinhado com a fase cristalina *standard* (04-006-9376). No entanto, também mostra a presença de um baixo teor de pirofosfato de cálcio (CPP) como fase secundária, comprovada pela presença do terceiro pico de difração mais intenso do CPP em  $2\theta = 28,90^\circ$  (04- 009- 3876).

A dopagem do TCP com 3 mol.%  $\text{Fe}^{2+}$  resulta num deslocamento de todos os picos do difratograma para a direita, sugerindo uma alteração dos parâmetros da rede cristalina do TCP, indicativo da incorporação do ião ferro na rede. A análise quantitativa deste pó apresenta uma diminuição do CPP e um aumento na quantidade de  $\beta$ -TCP, relativamente ao TCP não dopado.

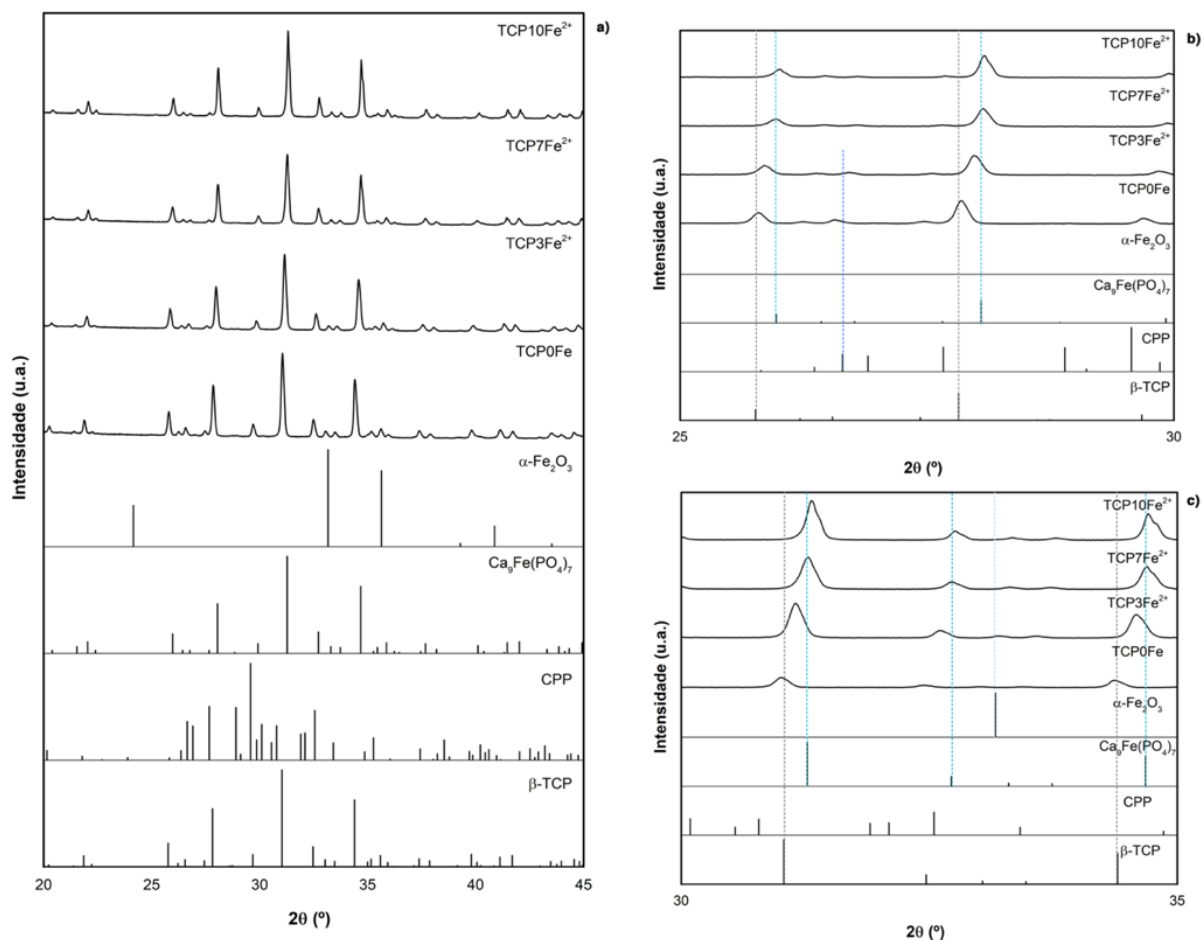


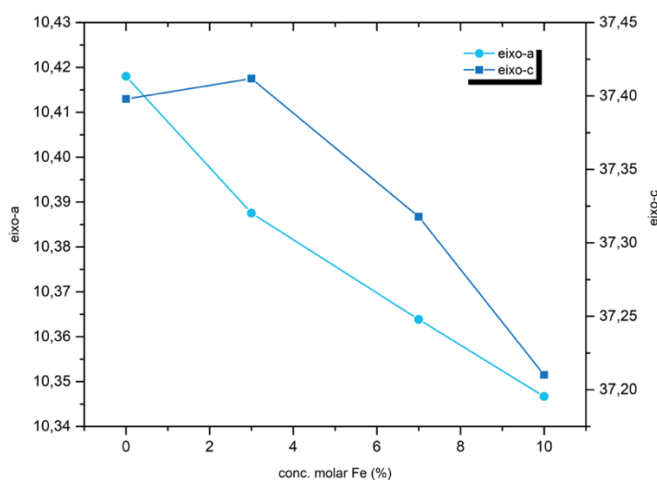
Figura 15 - (a) Difratomogramas dos pós de fosfatos de cálcio dopados com diferentes concentrações de ferro, com o ião precursor  $\text{Fe}^{2+}$ , calcinados a  $1000^\circ\text{C}$  e as respectivas fichas PDF utilizadas para a identificação das fases presentes: 04-006-9376 ( $\beta$ -TCP), 04-009-3876 (CPP), 04-008-4393 [ $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ ] e 04-007-9266 ( $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ); (b) ampliação do difratograma (a) entre  $2\theta = 25$  e  $30^\circ$  e (c) ampliação do difratograma (a) entre  $2\theta = 30$  e  $35^\circ$ .

Tabela 4 - Quantificação das diferentes fases cristalinas presentes nos pós de fosfatos de cálcio dopados com diferentes concentrações de ferro obtida por refinamento de Rietveld.

Quantificação das fases – método de Rietveld (wt.%)				
Amostra	$\beta$ -TCP	CPP	$\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$	$\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$
TCP0Fe	96,6	3,4	-	-
TCP3Fe <sup>2+</sup>	99,0	1,0	-	-
TCP7Fe <sup>2+</sup>	22,2	-	77,8	-
TCP10Fe <sup>2+</sup>	16,7	-	82,9	0,4

Com o aumento do teor de ião ferro (pós TCP7Fe<sup>2+</sup> e TCP10Fe<sup>2+</sup>), a fase Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub> surge como fase maioritária. Este fosfato cálcio-ferro é um composto tipo *whitlockite*, estruturalmente relacionado com o β-TCP, de sistema cristalográfico trigonal e *space group* R3c.<sup>88,89</sup> Sendo os picos correspondentes a esta fase cristalina em valores de 2θ muito semelhantes ao padrão do β-TCP, foi necessário uma análise mais focada no intervalo de varrimento 2θ entre 30° e 35° (Figura 15b). Nesta figura pode observar-se que os picos do pó TCP7Fe<sup>2+</sup> sobrepõem-se aos picos de difração do padrão da fase Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub>, confirmando a presença da mesma. Nos pós dopados com a concentração de ferro mais elevada (TCP10Fe<sup>2+</sup>) surge a presença residual de hematite (α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Figura 15a e Tabela 4). No difratograma não é possível visualizar os picos correspondentes à hematite, no entanto, estes estão presentes pois só assim se consegue detetar no refinamento de Rietveld. Também o deslocamento dos picos para a direita torna-se mais evidente para o teor de ferro mais elevado, o que indica a presença desta terceira fase.

A alteração dos parâmetros de rede é outro fator importante para perceber se o ião dopante entrou na rede do fosfato tricálcico. A Figura 16 apresenta os parâmetros de rede para todas as composições dos pós TCP-Fe.



**Figura 16 - Influência da concentração de Fe nos parâmetros de rede a e c na estrutura do β-TCP. Parâmetros de rede medidos para TCP0Fe: a = 10,4180 Å; c = 37,3979 Å; e para TCP10Fe<sup>2+</sup>: a = 10,3467 Å; c = 37,2101 Å.**

Analisando a Figura 16 pode verificar-se que com o aumento da concentração de ferro na composição dos pós TCP-Fe há uma diminuição dos parâmetros de rede dos eixos *a* e *c*. Contudo, na dopagem com 3 mol.% há um aumento do eixo *c*, voltando a diminuir logo de seguida em 7 mol.%. O eixo *a* diminui consecutivamente com o aumento da concentração molar do ferro. A célula unitária do  $\beta$ -TCP apresenta  $a = b = 10,4180 \text{ \AA}$  e  $c = 37,3979 \text{ \AA}$ , mostrando-se de acordo com os valores apresentados na literatura.<sup>3,58</sup> O refinamento dos parâmetros dos restantes pós teve como base os valores da fase  $\beta$ -TCP do pó TCP0Fe.

O espectro FT-IR dos pós TCP-Fe na Figura 17 mostra-se coerente com os resultados de difração de raios-X previamente apresentados. Segundo Singh et al.,<sup>16</sup> as vibrações características do  $\beta$ -TCP puro são determinadas a 554, 586, 602, 611, 944, 976, 1041, 1140 e 1180  $\text{cm}^{-1}$ , nas quais o grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  apresenta os seus quatro modos de vibração:  $\nu_1$  em 900-1000  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_2$  em 400-450  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_3$  em 1000- 1200  $\text{cm}^{-1}$  e  $\nu_4$  em 500-650  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>16,85,90,91</sup>

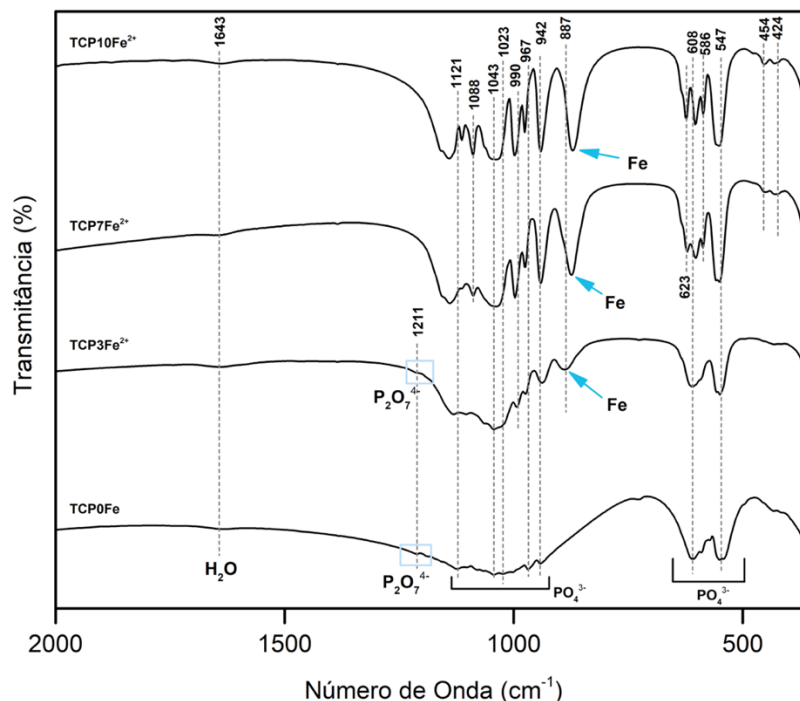


Figura 17 - Espectro FT-IR dos pós de TCP-Fe dopados com diferentes concentrações de ferro, calcinados a 1000°C.

A banda a  $\sim 1211 \text{ cm}^{-1}$  associada ao grupo  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  indica a presença de pirofosfato de cálcio (CPP) no pós de TCP0Fe e TCP3Fe, sendo de menor

intensidade neste último, confirmando os resultados obtidos por DRX e análise quantitativa de fases (Figura 15 e Tabela 4). Com a dopagem, o aparecimento da banda de absorção a  $\sim 887\text{ cm}^{-1}$  é comum para todas as composições, havendo um deslocamento para um número de onda mais baixo e um aumento de intensidade com o aumento da concentração molar de ferro, como reportado por Singh et al.<sup>16</sup> Nos pós TCP7Fe<sup>2+</sup> e TCP10Fe<sup>2+</sup>, as bandas de absorção associadas ao modo vibracional  $\nu_2$  do grupo fosfato apresentam um aumento de intensidade com o aumento da concentração molar do ferro.

Outra indicação da presença do ferro nos pós, além da distorção dos parâmetros de rede, é a coloração que se torna mais rosa com o aumento da concentração de ferro, como é possível verificar na Figura 18.



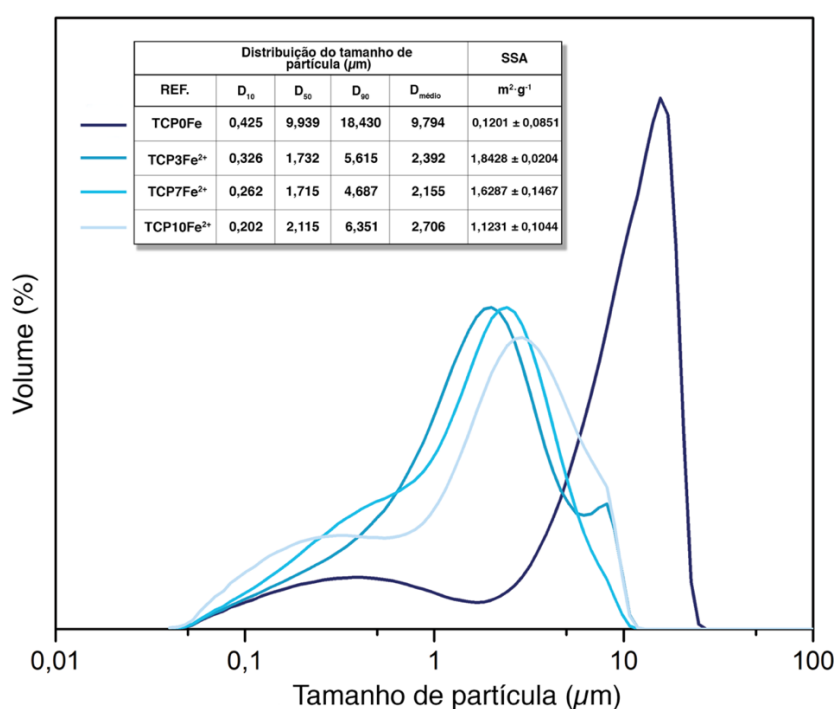
Figura 18 - Fotografias dos pós TCP-Fe calcinados a 1000°C e peneirados a 40  $\mu\text{m}$ : A - TCP0Fe, B - TCP3Fe<sup>2+</sup>, C - TCP7Fe<sup>2+</sup> e D - TCP10Fe<sup>2+</sup>.

De acordo com a literatura, a presença de Fe<sup>2+</sup> poderá atribuir a coloração amarelada aos pós, enquanto que a presença de Fe<sup>3+</sup> lhes confere um cor mais avermelhada. Desta forma os pós TCP10Fe<sup>2+</sup> apresentam uma coloração rosa/avermelhada mais intenso que os restantes, que poderá ser atribuída à presença de hematite (óxido de ferro (III)) detetada no DRX (Figura 15, Tabela 4) caracterizada por apresentar uma cor vermelho-sangue.<sup>84</sup>

Os resultados obtidos, DRX, FTIR e coloração dos pós, indicam que as condições de síntese e secagem usadas, permitiram evitar a oxidação espontânea do Fe (II) para Ferro (III), garantindo a entrada de Fe<sup>2+</sup> na rede cristalina por substituição do Ca<sup>2+</sup>. Para teores de ferro mais elevados (10 mol.%), as condições

de síntese usadas não permitiram a entrada de todo o Fe(II) na rede, formando um óxido de ferro como fase secundária minoritária (hematite), contribuindo para uma coloração mais avermelhada dos pós.

Na Figura 19 estão apresentadas as curvas de distribuição do tamanho de partícula (DTP) dos pós TCP-Fe peneirados a 40  $\mu\text{m}$ , bem como uma tabela com os respectivos  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$  (10, 50 e 90 vol.% das partículas estão abaixo do valor de tamanho de partícula indicado),  $D_{\text{médio}}$  (tamanho médio das partículas) e área superficial específica (SSA).



**Figura 19 - Distribuição do tamanho de partícula nos pós TCP-Fe com diferentes concentrações de Fe<sup>2+</sup> calcinados a 1000°C e peneirados a 40  $\mu\text{m}$ .**

Da análise dos resultados é possível verificar que, todos os pós dopados apresentam distribuição de tamanhos de partícula semelhantes, com tendência bimodal assimétrica. O pó não dopado (TCP0Fe – curva a azul escuro) apesar de apresentar também uma tendência bimodal, apresenta uma DTP mais alargada que os pós dopados, com uma população maior de partículas mais grossas centrada a 15,65  $\mu\text{m}$ , com  $D_{50} \approx 9,939 \mu\text{m}$ ,  $D_{10}$  abaixo dos 0,425  $\mu\text{m}$  e  $D_{90}$  abaixo dos ~18,430  $\mu\text{m}$ . O valor da área superficial específica corrobora estes resultados, apresentando uma média de 0,1201  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , inferior aos restantes pós dopados.

Os pós dopados apresentam partículas mais finas com  $D_{\text{médio}}$  2,392, 2,155 e 2,706 para TCP3Fe<sup>2+</sup>, TCP7Fe<sup>2+</sup> e TCP10Fe<sup>2+</sup>, respetivamente. Comparando os pós dopados com as diferentes concentrações de Fe, verifica-se uma tendência decrescente do tamanho das partículas com o aumento do teor do ião Ferro até um máximo de 7 mol.% Fe. Para pós com teores de ferro superiores (10 mol.%), esta tendência parece reverter-se.

Para complementar estes resultados, foi avaliada a morfologia/tamanho dos pós por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) como se pode ver na Figura 20. Pela observação das micrografias apresentadas, pode verificar-se que as distribuições dos tamanhos de partículas (Figura 19) são coerentes com as morfologias/tamanhos. Os pós não dopados apresentam tamanhos de partículas superiores, com diminuição de tamanhos e distribuição de tamanhos de partícula menos alargada, à medida que o teor de ião ferro aumenta. Isto pode dever-se ao facto de o ferro apresentar um raio iónico inferior ao cálcio. A presença de partículas mais finas origina a formação de agregados de partículas durante os processos de síntese e calcinação, o que poderá explicar o facto do pó dopado com 10 mol.% ferro aparentar ter um tamanho médio de partículas superior (Figura 19). A adição de ferro influencia também a morfologia das partículas dos pós dopados: pequenas partículas primárias agregam-se formando partículas porosas, contrariamente ao pó não dopado que apresenta partículas maiores e mais compactas. À semelhança da co-dopagem com manganês em trabalhos anteriores<sup>3</sup>, as partículas primárias diminuem de tamanho com o aumento da concentração molar de ferro formando agregados entre elas durante a síntese e a calcinação. Afiguram-se mais redondas e com aspeto granular relativamente ao pó de referência.

De forma a analisar a distribuição dos iões cálcio, ferro e fósforo nos pós sintetizados, foi feito mapeamento destes iões por EDS, cujos resultados estão apresentados na Figura 20c. Como seria de esperar, o ião ferro não é visível nos pós não dopados, estando homoganeamente distribuído para todos os pós dopados e em maior quantidade com o aumento do teor de ferro.

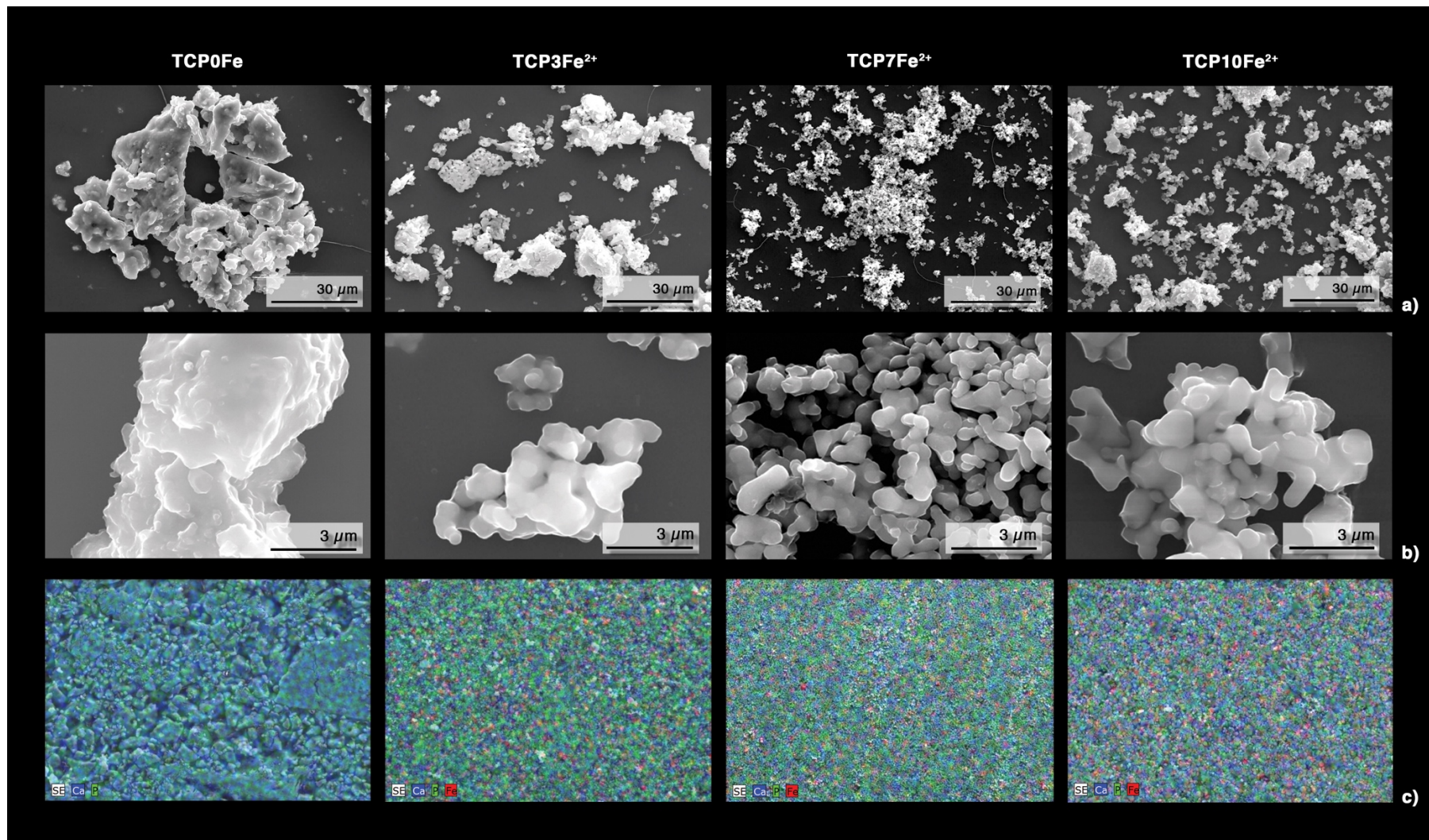


Figura 20 - Micrografias obtidas por SEM dos pós com as diferentes concentrações molares de Fe com as ampliações a) 1K; b) 10K; e respetivo mapeamento da superfície (c)



### 2.3.1.2. Efeito do estado de oxidação do ião ferro precursor

Além da variação do teor de ião ferro na composição dos pós, foi estudada também a influência do ião precursor ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ ) na composição das fases cristalinas formadas e microestrutura dos pós. Para tal selecionaram-se duas concentrações de ião ferro (7 e 10 mol.%) e duas fontes diferentes de ião precursor, de forma a ter presentes dois estados de oxidação do ferro ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ). Como explicado no procedimento experimental, os pós TCP- $\text{Fe}^{2+}$  foram sintetizados com  $\text{FeCl}_2$  e os pós TCP- $\text{Fe}^{3+}$  foram sintetizados com  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , em que os estado de oxidação de cada ferro precursor são o (II) e o (III), respetivamente.

A Figura 21 apresenta os difratogramas dos pós TCP-Fe, com as fichas PDF das respetivas fases cristalinas que se encontram nos pós ( $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  e  $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ): (a)  $2\theta$  –  $20^\circ$  a  $45^\circ$  e, (b) ampliação do difratograma apresentado em (a) em  $2\theta$  –  $25^\circ$  a  $30^\circ$  e (c) em  $2\theta$  -  $30^\circ$  a  $35^\circ$ . A Tabela 5 apresenta a análise quantitativa das fases dos referidos pós, obtida por refinamento de Rietveld.

Numa primeira análise, é possível verificar que os picos dos pós TCP- $\text{Fe}^{3+}$  são menos intensos e ligeiramente mais largos que os picos dos pós TCP- $\text{Fe}^{2+}$  e apresentam-se ligeiramente deslocados para ângulos  $2\theta$  inferiores. Analisando os valores presentes na Tabela 5 resultantes da análise quantitativa de fases, observa-se que, os pós cujo precursor foi o  $\text{Fe}^{3+}$  não apresentam na sua composição  $\beta$ -TCP, sendo o fosfato de cálcio-ferro  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  a fase maioritária, com cerca de 98% do total. A hematite aparece como segunda fase, em minoria relativamente à fase principal, mas ligeiramente em maior quantidade para os pós obtidos com  $\text{Fe}^{3+}$  (TCP7  $\text{Fe}^{3+}$  e TCP10 $\text{Fe}^{3+}$ ) quando comparado com o pó com 10mol% de ferro obtido com precursor  $\text{Fe}^{2+}$  (TCP10 $\text{Fe}^{2+}$ ).

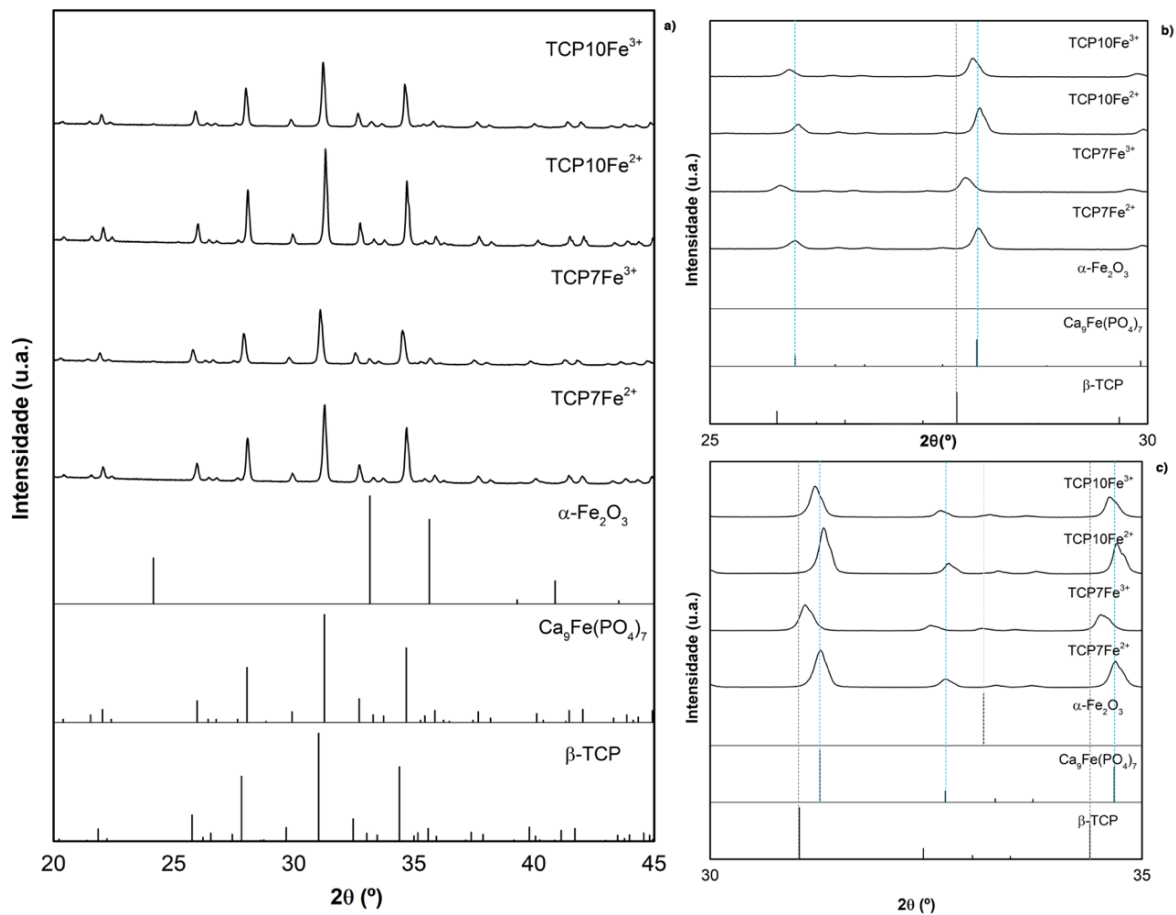


Figura 21 – (a) Difratomogramas dos pós de fosfatos de cálcio dopados com duas concentrações de íon ferro (7 e 10 mol.%), usando como precursores iniciais dois estados de oxidação diferentes  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ , calcinados a  $1000^\circ\text{C}$  e as respectivas fichas PDF utilizadas para a identificação das fases presentes. (b) ampliação do difratograma (a) em  $2\theta = 25\text{-}30^\circ$ . (c) ampliação do difratograma (a) em  $2\theta = 30\text{-}35^\circ$ .

Tabela 5 - Análise quantitativa de fases obtida por refinamento de Rietveld.

Amostra	Quantificação das fases – método de Rietveld (wt.%)		
	$\beta$ -TCP	$\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$	$\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$
TCP7 $\text{Fe}^{2+}$	22,1	77,8	-
TCP7 $\text{Fe}^{3+}$	36,0	62,6	1,4
TCP10 $\text{Fe}^{2+}$	16,7	82,9	0,4
TCP10 $\text{Fe}^{3+}$	25,6	72,7	1,6

De forma a complementar os resultados obtidos por DRX, os pós foram analisados por FT-IR cujos espectros se apresentam na Figura 22.

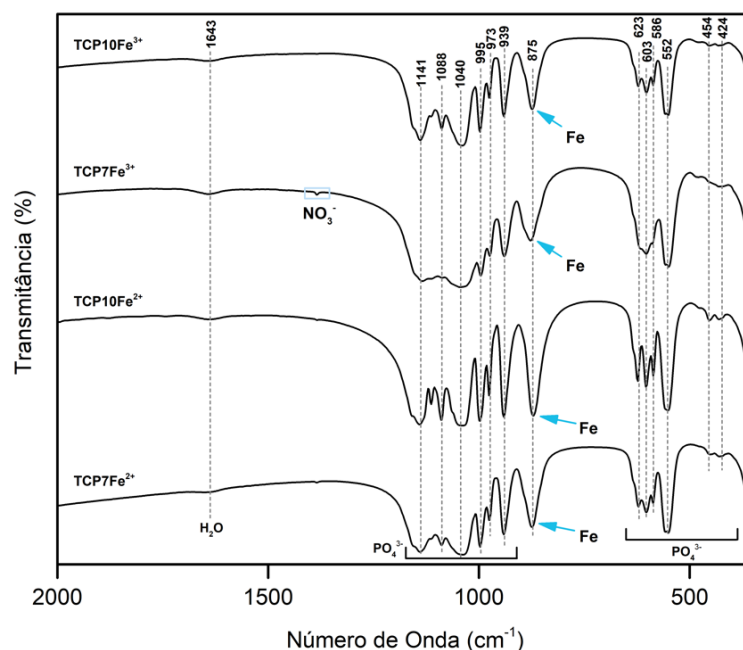


Figura 22 - Espectro FT-IR dos pós de TCP-Fe com 7 e 10 mol.% de Fe, obtidos com os precursores de diferentes estados de oxidação do íon Fe ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ), calcinados a  $1000^\circ\text{C}$ .

Da análise dos resultados é possível verificar que as bandas correspondentes aos modos de vibração dos tetraedros  $\text{PO}_4$  ( $\nu_2$  a  $400\text{-}450\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_4$  a  $500\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ) são mantidas em todos os espectros, embora nos pós obtidos com precursor  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{TCP7Fe}^{3+}$  e  $\text{TCP10Fe}^{3+}$ ) sejam menos intensas do que nos pós com o precursor  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{TCP7Fe}^{2+}$  e  $\text{TCP10Fe}^{2+}$ ). A banda a  $875\text{ cm}^{-1}$ , identificada como sendo a banda de absorção relativa à presença do ferro na composição de cada pó, é mais intensa para os pós em que se usou ferro (II) como precursor de síntese.<sup>16</sup> A banda visível a  $\sim 1643\text{ cm}^{-1}$  corresponde à presença de água adsorvida nas partículas dos pós, presente em todos eles.

Como anteriormente referido, a coloração do pó poderá ser também um bom indicador do teor e do estado de oxidação do íon ferro. A Figura 23 apresenta as cores dos pós  $\text{TCP7Fe}^{2+}$  (A) e  $\text{TCP7Fe}^{3+}$  (C) bem como,  $\text{TCP10Fe}^{2+}$  (B) e  $\text{TCP10Fe}^{3+}$  (D).



Figura 23 - Imagens dos pós TCP-Fe obtidos com diferentes teores de ferro e estado de oxidação do íon precursor, calcinados a 1000°C.

Como se pode verificar, para a mesma concentração de íon ferro, as cores dos pós são bastante distintas, se obtidas com íon precursor  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ . Os pós TCP-  $\text{Fe}^{3+}$  (C e D) apresentam uma cor rosa/avermelhada mais intensa, quando comparados com os pós TCP- $\text{Fe}^{2+}$  (A e B), devida ao estado de oxidação do ferro presente (Ferro (III) característico de cor avermelhada) e pela presença de hematite. Em conformidade com os resultados anteriores, estes resultados indicam que, o processo de obtenção dos pós permitiu a entrada de Fe (II) na rede quase na totalidade para os pós obtidos com precursor  $\text{Fe}^{2+}$ . Contrariamente, a utilização de  $\text{Fe}^{3+}$  como precursor não permite uma incorporação total na rede cristalina, formando-se maiores quantidades de hematite. Sendo o cálcio um íon de valência 2+, um íon da mesma valência ( $\text{Fe}^{2+}$ ) terá maior afinidade para a substituição deste, criando menos lacunas na rede cristalina, do que um íon com valência superior ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

De modo a avaliar qual o efeito do estado de oxidação do íon ferro precursor no tamanho e distribuição de tamanhos das partículas dos pós, são apresentadas na Figura 24 as curvas de DTP juntamente com a tabela de valores  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ,  $D_{\text{médio}}$  e área superficial específica (SSA).

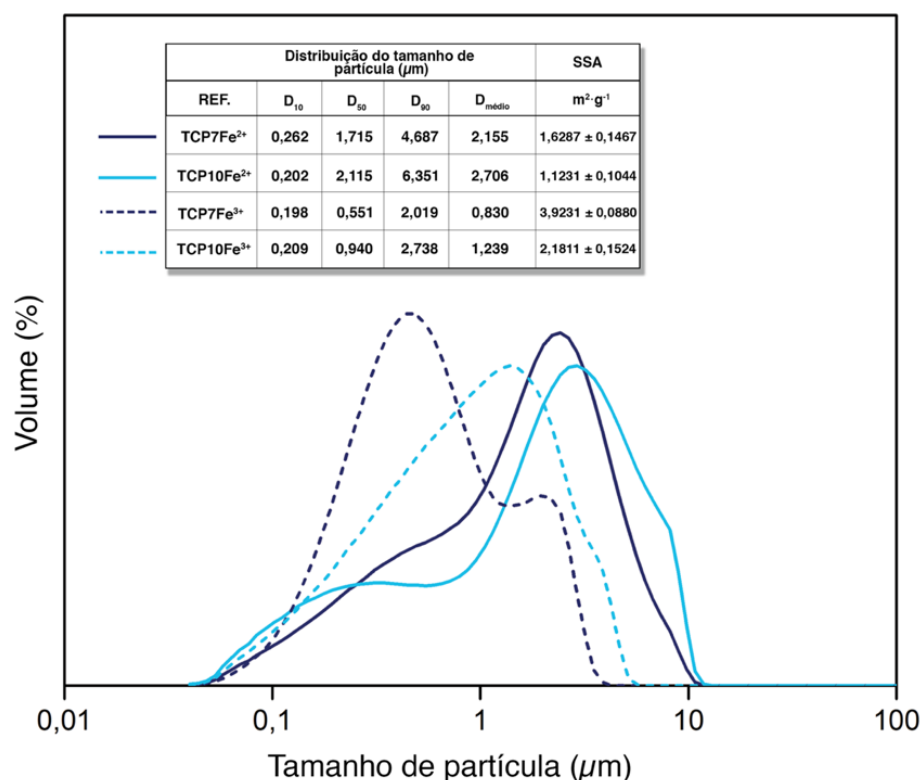


Figura 24 - Distribuição dos tamanhos de partícula dos pós de TCP-Fe obtidos com 7 e 10 mol.% de ferro usando Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> como precursores do ião Fe, calcinados a 1000°C e peneirados a 40  $\mu\text{m}$ .

Os pós TCP7Fe<sup>2+</sup>, TCP7Fe<sup>3+</sup> e TCP10Fe<sup>2+</sup> apresentam uma distribuição de tamanhos de partícula unimodal alargada, com pequenos ombros (essencialmente TCP7Fe<sup>3+</sup>) resultantes da aglomeração de partículas finas. Comparando as distribuições de tamanhos de partícula para os pós com os mesmos teores de ião ferro e obtidos com diferentes precursores (Fe<sup>2+</sup> ou Fe<sup>3+</sup>) é possível verificar que os pós obtidos com Fe<sup>3+</sup> apresentam tamanhos de partícula inferiores. Em todos os pós, 10% das partículas estão abaixo de 0,200  $\mu\text{m}$ . Para os pós TCP-Fe<sup>3+</sup> com 7 mol.% e 10 mol.%, 90% das partículas dos pós têm tamanhos abaixo de 2,019  $\mu\text{m}$  e 2,738  $\mu\text{m}$ , respectivamente, enquanto que para os pós TCP-Fe<sup>2+</sup> com 7 mol.% e 10 mol.%, os  $D_{90}$  são significativamente maiores, ou seja, 4,687  $\mu\text{m}$  e 6,351  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os valores de SSA corroboram estes resultados.

As micrografias obtidas por SEM e o mapeamento dos iões Ca, Fe e P em EDS dos respectivos pós são mostradas na Figura 25.

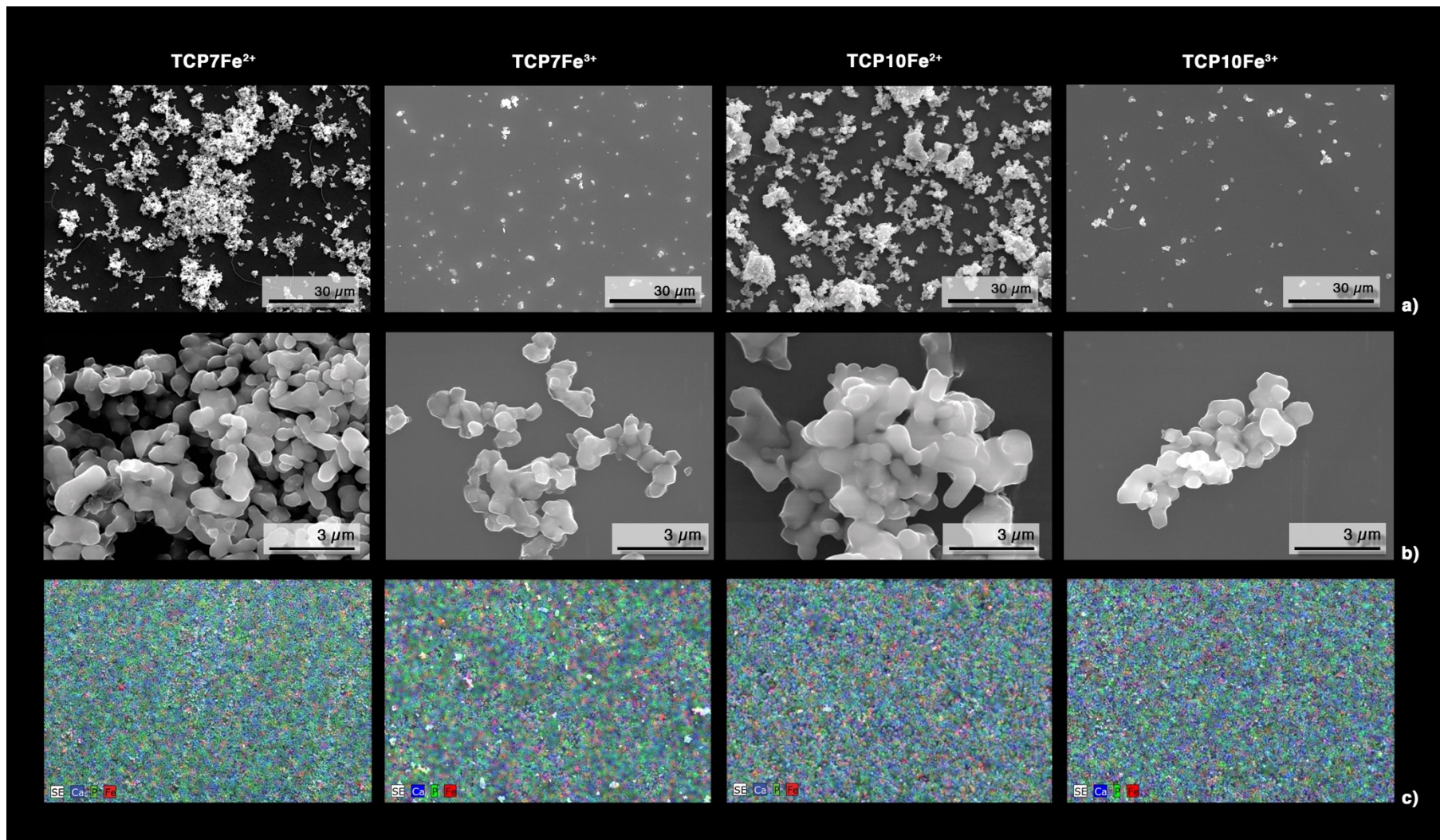


Figura 25 - Micrografias obtidas por SEM dos pós com os diferentes estados de oxidação do ião Fe precursor ( $\text{Fe}^{2+}$  /  $\text{Fe}^{3+}$ ) com as ampliações a) x1K; b) x10K; e respectivo mapeamento da superfície, c).

Da análise da figura é possível verificar que os pós obtidos com precursor  $\text{Fe}^{2+}$  apresentam-se mais aglomerados comparativamente aos obtidos com  $\text{Fe}^{3+}$ , independentemente do teor de ião ferro, em concordância com as distribuições de tamanhos de partícula apresentadas na Figura 24. Os pós TCP- $\text{Fe}^{2+}$  mostram agregados porosos formados a partir de partículas primárias finas resultando em valores de tamanho médio e de  $D_{90}$  maiores, como é o caso do pó TCP7 $\text{Fe}^{2+}$ . Estas diferenças nas distribuições de tamanhos de partícula entre pós obtidos com diferentes precursores, poderão não ser tão significativas, se todos os pós forem sujeitos a condições de moagem semelhantes em todo o lote de pó obtido na síntese. De facto, estas distribuições foram obtidas em porções de pó resultantes da peneiração a  $40\ \mu\text{m}$ , tendo-se verificado que para os pós com  $\text{Fe}^{3+}$  a quantidade de pó retida no peneiro foi muito superior do que para os pós com  $\text{Fe}^{2+}$ , sendo que o resíduo ao peneiro para 7 mol.% e 10 mol.% foi, respetivamente, de  $\sim 89,8\%$  e  $\sim 91,6\%$ . Isto poderá significar que, nos pós obtidos com  $\text{Fe}^{3+}$  as partículas primárias poderão ser mais finas, formando agregados com dimensões acima de  $40\ \mu\text{m}$ , tendo sido avaliada em DTP e SEM apenas a fração de partículas mais finas. Por certo, seria de esperar que, sendo o ião  $\text{Fe}^{3+}$  menor do que o ião  $\text{Fe}^{2+}$ , se formassem partículas primárias de menor tamanho para os pós com precursor  $\text{Fe}^{3+}$ .

O mapeamento dos iões Fe, P e Ca em EDS (Figura 25c), mostra uma distribuição uniforme dos iões em todos os pós, sem diferenças significativas entre pós obtidos a partir de precursor com diferente estado de oxidação do ião ferro, para o mesmo teor de ião ferro.

### **2.3.1.3. Efeito da temperatura de calcinação**

A Figura 26 e a Tabela 6 apresentam os DRX e análise quantitativa, respetivamente, dos pós TCP7 $\text{Fe}^{2+}$  e TCP7 $\text{Fe}^{3+}$  calcinados a  $1000^\circ\text{C}$  e a  $1100^\circ\text{C}$ , juntamente com as correspondentes fichas PDF das fases cristalinas presentes na composição dos diferentes pós. A Figura 26 (a) apresenta os difratogramas na gama de  $2\theta$  entre  $20-45^\circ$  e a Figura 26 (b) apresenta uma área ampliada da Figura 26 (a) na gama de  $2\theta$  entre  $25-30^\circ$  e a Figura 26 (c) apresenta uma área ampliada da Figura 26 (a) em  $2\theta = 30-35^\circ$ .

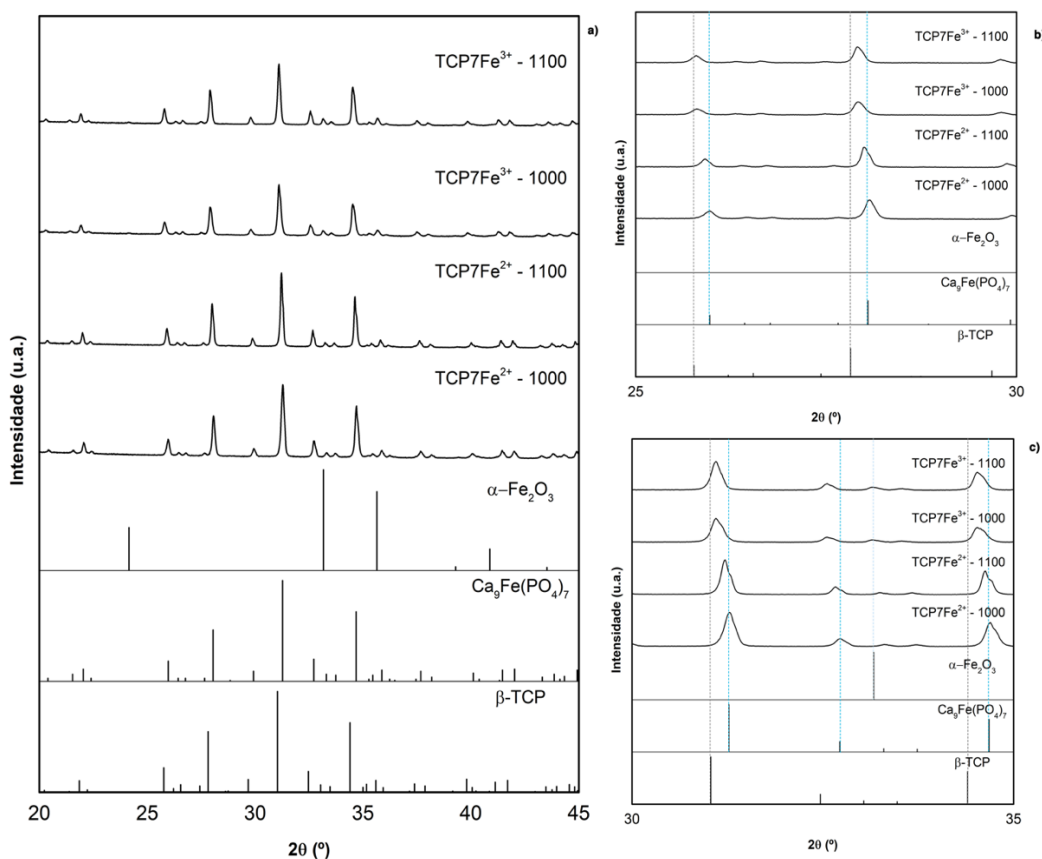


Figura 26 - (a) Difratomogramas dos pós de fosfatos de cálcio dopados com 7 mol% de Fe (II) e (III), calcinados a 1000°C e a 1100°C e as respectivas fichas PDF utilizadas para a identificação das fases presentes: 04-006-9376 ( $\beta$ -TCP), 04-008-4393 [ $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ ] e 04-007-9266 ( $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ); (b) ampliação do difratograma (a) entre  $2\theta = 25$  e  $30^\circ$  e (c) ampliação do difratograma (a) entre  $2\theta = 30$  e  $35^\circ$ .

Tabela 6 - Análise de fases quantitativa obtida por refinamento de Rietveld dos pós estudados.

Amostra	Quantificação das fases – método de Rietveld (wt.%)		
	$\beta$ -TCP	$\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$	$\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$
TCP7Fe <sup>2+</sup> - 1000	22,2	77,8	-
TCP7Fe <sup>2+</sup> - 1100	28,2	71,8	-
TCP7Fe <sup>3+</sup> - 1000	36,0	62,6	1,4
TCP7Fe <sup>3+</sup> - 1100	26,3	72,1	1,6

Como era de esperar, o aumento da temperatura de calcinação aumenta a intensidade dos picos, em ambos os pós, tornando-os mais definidos e menos largos, confirmando o aumento da sua cristalinidade. Relativamente à análise quantitativa, é possível verificar que, para o mesmo pó, o aumento da temperatura origina um aumento da fase  $\beta$ -TCP e consequente diminuição da fase  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ .



para o primeiro caso cujo precursor foi o  $\text{Fe}^{2+}$ . No segundo caso, em que o precursor usado foi o ferro (III), verifica-se um aumento das fases  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  e  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  resultantes da possível oxidação espontânea durante o tratamento térmico. Estes valores estão de acordo com os ligeiros deslocamentos dos picos de difração de DRX para valores de  $2\theta$  inferiores observados na Figura 26b.

A Figura 27 apresenta os espectros de infravermelho dos pós  $\text{TCP7Fe}^{2+}$  e  $\text{TCP7Fe}^{3+}$  calcinados a  $1000^\circ\text{C}$  e  $1100^\circ\text{C}$ .

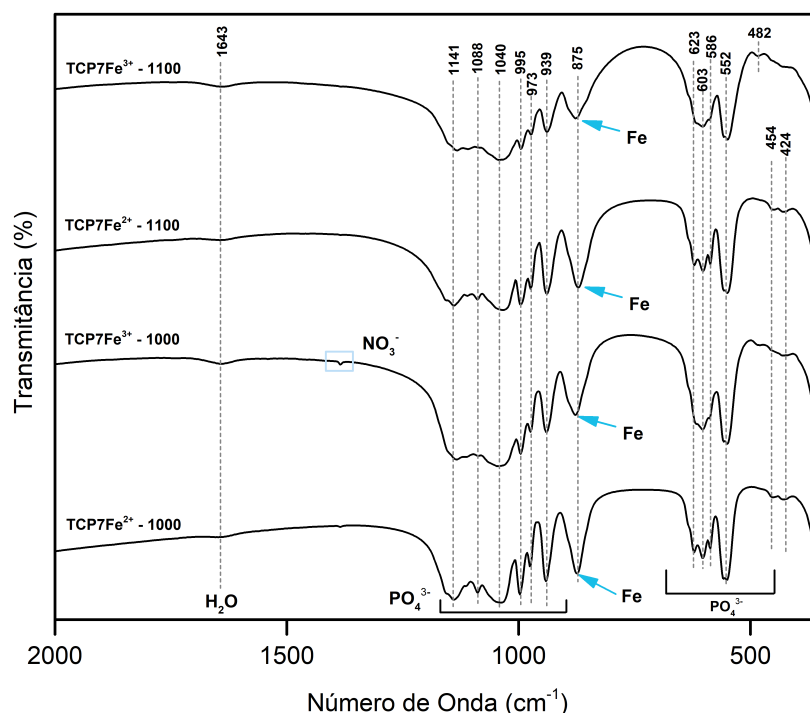


Figura 27 - Espectro FT-IR dos pós de TCP-7Fe obtidos com precursor  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  calcinados a diferentes temperaturas,  $1000^\circ\text{C}/1100^\circ\text{C}$ .

Da análise dos espectros, não é possível identificar diferenças significativas entre os pós calcinados a  $1000$  e  $1100^\circ\text{C}$ , exceto a banda vestigial referente ao  $\text{NO}_3^-$  que está presente nos pós calcinados a  $1000^\circ\text{C}$  e deixa de existir a  $1100^\circ\text{C}$ . Estes vestígios de nitratos são resultantes dos precursores da síntese e são eliminados na totalidade a  $1100^\circ\text{C}$ .

Na Figura 28, são apresentadas as cores dos pós  $\text{TCP7Fe}^{2+}$  e  $\text{TCP7Fe}^{3+}$  calcinados a  $1000^\circ\text{C}$  e  $1100^\circ\text{C}$ .



Figura 28 - Imagens dos pós TCP7Fe obtidos com precursor  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ , calcinados a 1000 e 1100°C e peneirados a 40  $\mu\text{m}$ . A – TCP7 $\text{Fe}^{2+}$  - 1000; B – TCP7 $\text{Fe}^{2+}$  - 1100; C - TCP7 $\text{Fe}^{3+}$  - 1000; D – TCP7 $\text{Fe}^{3+}$  - 1100.

O aumento da intensidade de cor nos pós calcinados a 1100°C revela uma alteração do estado de oxidação do íon Fe, conforme esperado, visto a calcinação ser feita em ar (atmosfera oxidante).

A Figura 29 mostra as curvas de DTP destes pós, juntamente com uma tabela auxiliar com os valores de  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ,  $D_{\text{médio}}$  e SSA.

Como já retratado em trabalhos anteriores<sup>9</sup>, o aumento da temperatura de calcinação provoca o aumento do tamanho de partícula e conseqüente diminuição da área superficial específica SSA. No presente trabalho, os resultados obtidos estão em concordância com a literatura. Em ambos os pós, para o aumento de temperatura 1000°C  $\rightarrow$  1100°C, o aumento do tamanho de partícula é facilmente visível e significativo. O tamanho médio do pó TCP7 $\text{Fe}^{2+}$  aumenta de 2,155  $\mu\text{m}$  para 5,076  $\mu\text{m}$ , e no pó TCP7 $\text{Fe}^{3+}$  aumenta de 0,830  $\mu\text{m}$  para 1,669  $\mu\text{m}$ .

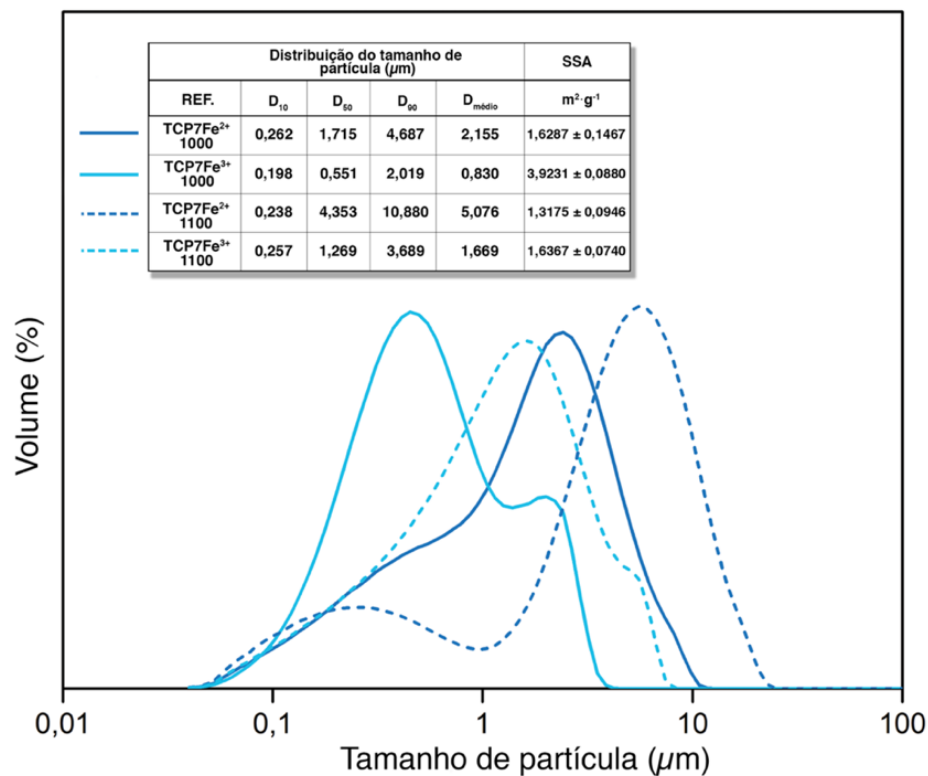


Figura 29 - Distribuição do tamanho de partícula dos pós TCP-7Fe<sup>2+</sup> e TCP-7Fe<sup>3+</sup>, calcinados a 1000°C e 1100°C e peneirados a 40  $\mu\text{m}$ .

A Figura 30 mostra as imagens obtidas em SEM dos pós tratados termicamente a 1000°C e a 1100°C.

Da análise das imagens é possível verificar que o aumento da temperatura promove uma forte ligação entre as partículas formando agregados de partículas mais compactas e de maior tamanho, em concordância com os resultados obtidos na DTP (Figura 29). As micrografias mais ampliadas mostram este efeito da temperatura de calcinação para ambos os pós. Comparativamente aos pós calcinados a 1000°C, onde se apresentam pequenos agregados porosos de partículas primárias, os pós a 1100°C exibem agregados mais coesos com as partículas primárias mais fundidas entre si, que por sua vez, formam partículas finais maiores.

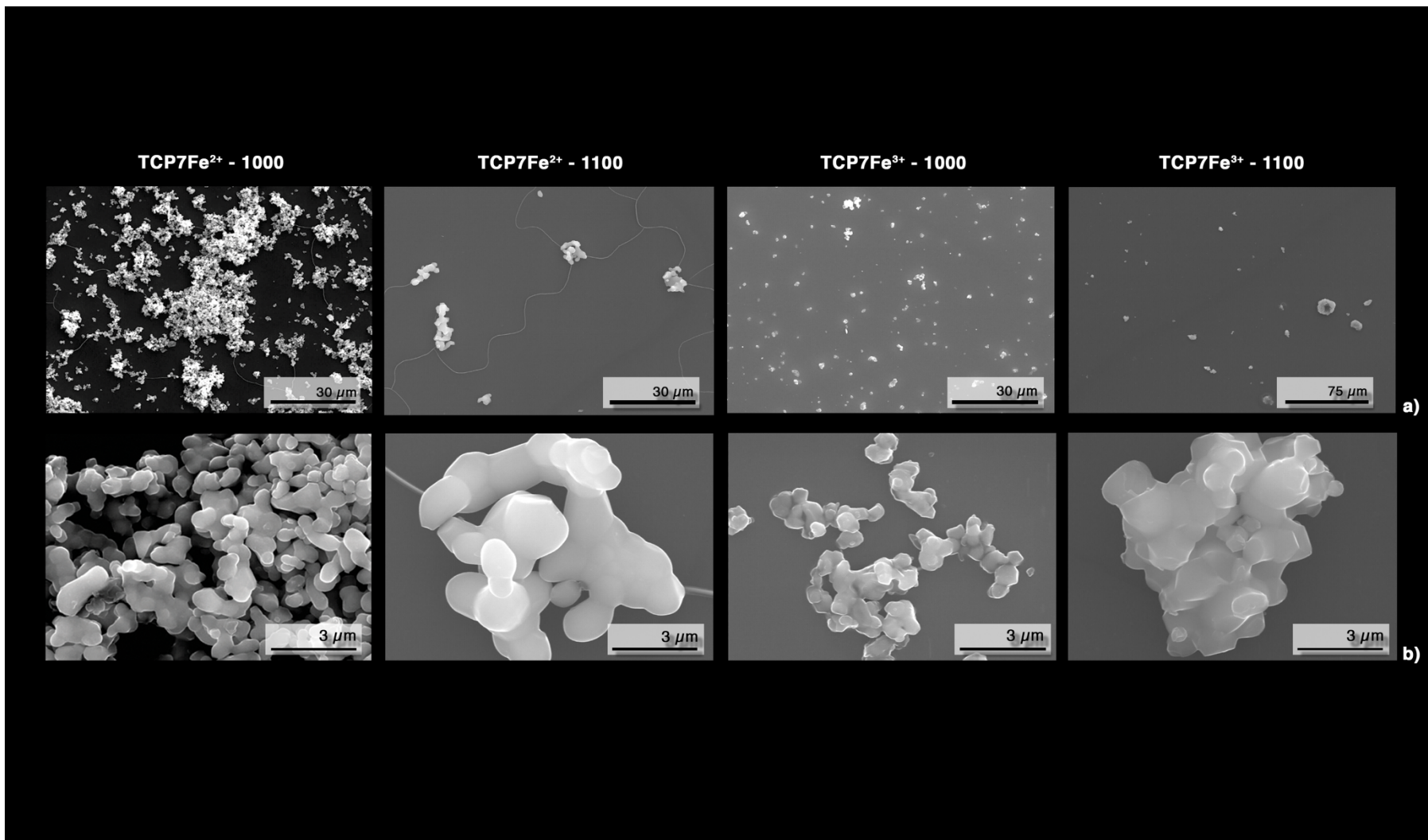


Figura 30 - Micrografias obtidas por SEM dos pós com os diferentes estados de oxidação do íon Fe precursor ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) e das diferentes temperaturas de calcinação com as ampliações a) x1K; b) x10K

### 2.3.2. Caracterização magnética dos pós de $\beta$ -TCP dopados com ferro

Na Figura 31 são apresentados os resultados da magnetização em função do campo magnético para os pós TCP-Fe com diferentes teores de ferro, calcinados a 1000°C. Em anexo (Anexo 1), encontram-se as curvas em separado.

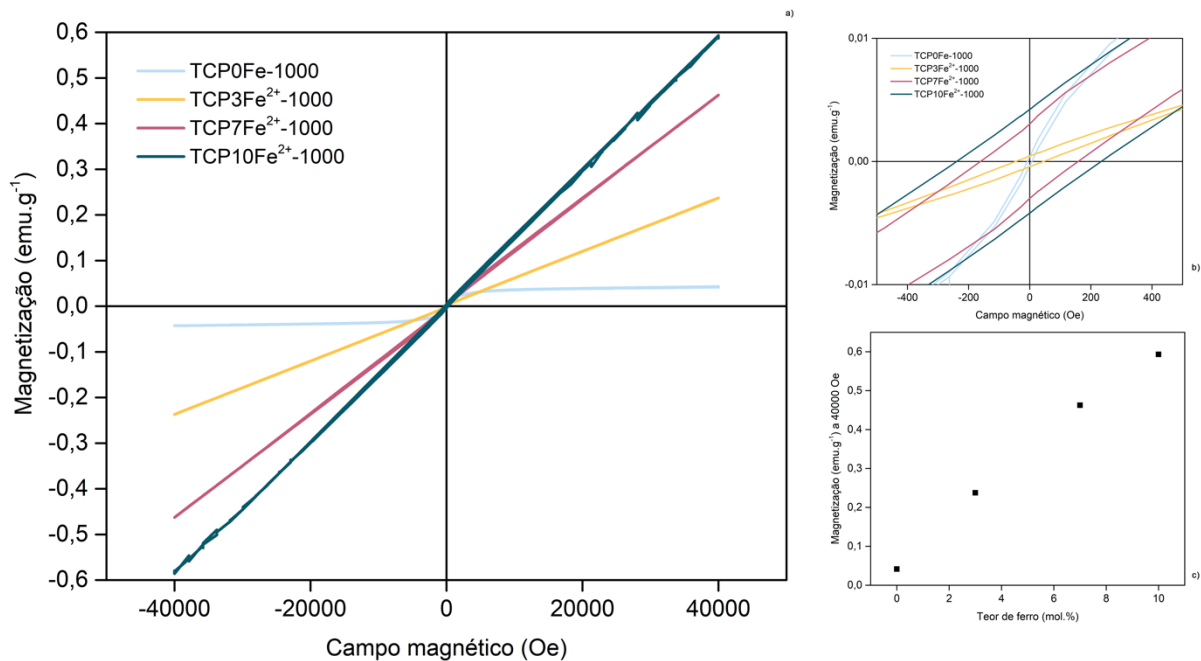
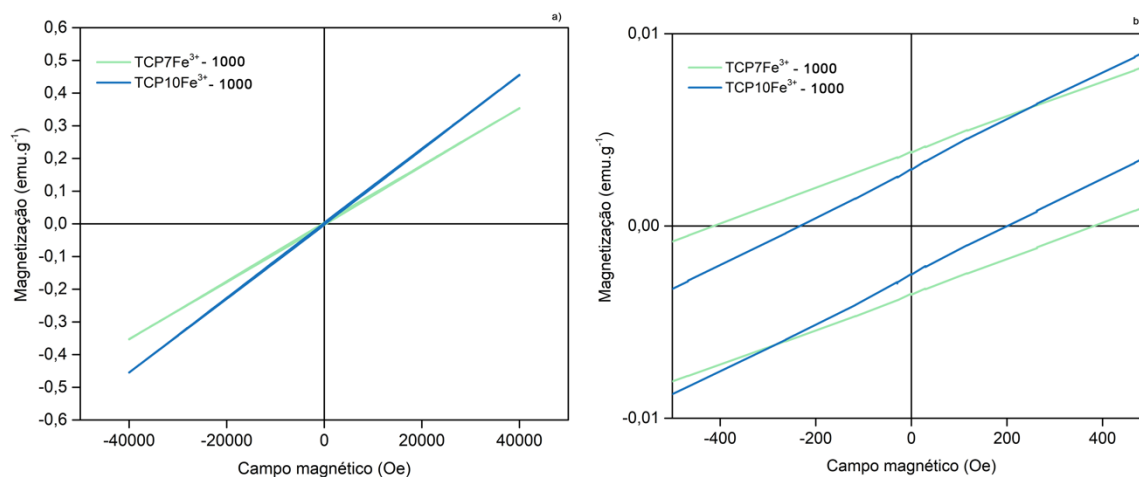


Figura 31 – Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado: a) pós TCP-Fe<sup>2+</sup> calcinados a 1000°C b) ampliação de a); c) aumento da magnetização a 40000 Oe com o aumento do teor de ferro.

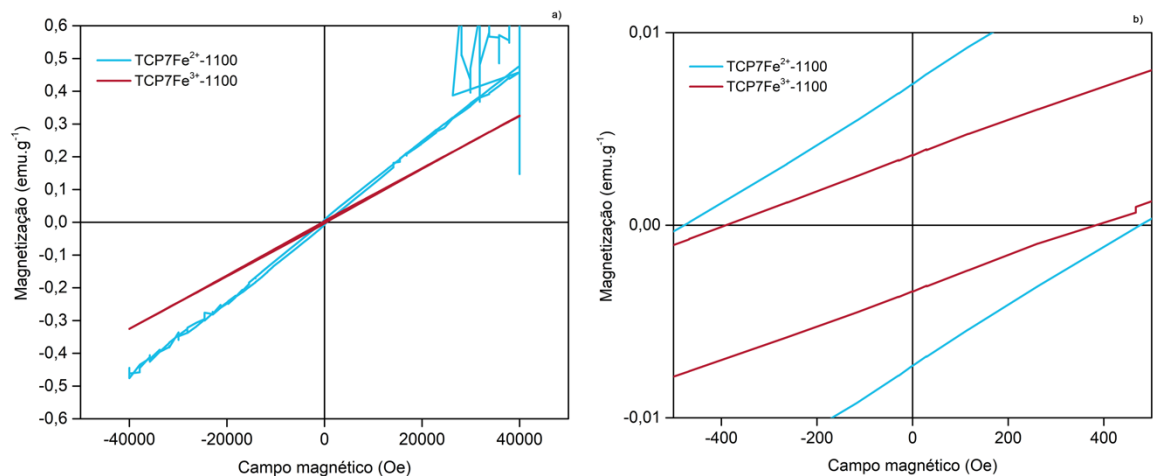
Todos os pós apresentam uma tendência linear característica de um comportamento aparentemente antiferromagnético por duas razões: a tendência linear para campos magnéticos mais elevados e a histerese magnética a campos baixos.<sup>92</sup> O pó não dopado, TCP0Fe-1000, apresenta um comportamento semelhante ao reportado por Singh et al.<sup>16</sup>, em que a magnetização satura para campos magnéticos reduzidos. A magnetização a 40 000 Oe (Figura 31c) aumenta com o aumento do teor de ferro, também com um aumento da histerese. O declive das curvas de magnetização aumenta com o aumento da presença da fase Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub> nos pós, indicando que a suscetibilidade magnética aumentou com o aumento do teor de ferro.

A Figura 32 apresenta a magnetização de saturação em função do campo magnético para os pós com 7 e 10 mol.% de ferro, obtidos com  $\text{Fe}^{3+}$  como ião precursor calcinados a  $1000^\circ\text{C}$ .



**Figura 32 - Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado: a) TCP-Fe<sup>3+</sup> calcinados a  $1000^\circ\text{C}$  onde b) é uma ampliação de a).**

Tal como verificado na Figura 31, as curvas de magnetização dos pós TCP obtidos com  $\text{Fe}^{3+}$  apresentam aparentemente também um comportamento antiferromagnético. Para a mesma quantidade de Ferro, comparando os pós obtidos com  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ , verifica-se que, para os mesmos teores de ferro, os pós TCP- $\text{Fe}^{2+}$  apresentam uma magnetização a 40 000 Oe mais elevada que os pós TCP- $\text{Fe}^{3+}$ , que poderá resultar da maior quantidade de ferro incorporado na rede do TCP nos locais do  $\text{Ca}^{2+}$ , como mostrado anteriormente. Também a presença da hematite como fase secundária e a consequente diminuição da fase  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  no TCP- $\text{Fe}^{3+}$  podem justificar este comportamento. Como a hematite apresenta um comportamento antiferromagnético<sup>93</sup> (os *spins* dos eletrões são antiparalelos), a sua presença pode justificar a diminuição da magnetização dos pós TCP- $\text{Fe}^{3+}$  em comparação com os TCP- $\text{Fe}^{2+}$ . A diminuição da histerese das curvas poderá estar associada à diminuição do tamanho das partículas.<sup>94</sup>

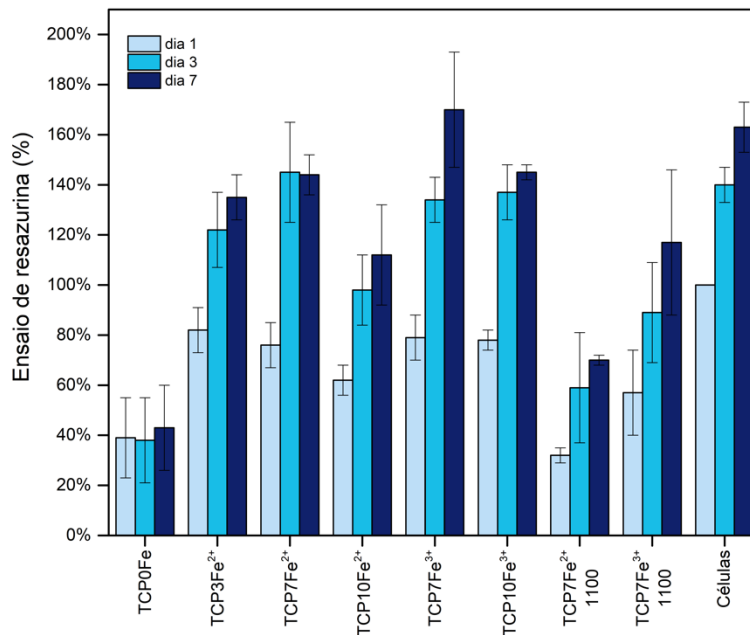


**Figura 33 - Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado: a) TCP7Fe<sup>2+</sup> e TCP7Fe<sup>3+</sup> calcinados a 1100°C onde b) é uma ampliação de a)**

A temperatura do tratamento térmico (Figura 33) também influencia a magnetização dos pós. No caso do pó TCP7Fe<sup>2+</sup>, o aumento da temperatura de calcinação para 1100°C aumenta ligeiramente a magnetização para 0,47731 emu.g<sup>-1</sup> a 40 000 Oe, contudo há um aumento notório da histerese da curva. Estes resultados sugerem que, o aumento da temperatura de calcinação poderá originar acomodações do ferro na estrutura cristalina, bem como a oxidação de algum ferro de valência 2+ para 3+ aumentando as lacunas na rede cristalina. A possibilidade da formação de uma fase minoritária com o aumento da temperatura, não quantificável por DRX, ou mesmo a existência de uma fase amorfa, não devem ser também descartadas.

### **2.3.3. Avaliação biológica dos pós β-TCP dopados com ferro**

Na Figura 34 são apresentados ensaios de biocompatibilidade/viabilidade celular realizados em 1x10<sup>4</sup> células.cm<sup>-2</sup> na linha de pré-osteoblastos MC3T3 durante 1, 3 e 7 dias para os vários pós TCP-Fe. O metabolismo celular foi avaliado pelo ensaio de resazurina e a atividade metabólica da ALP foi medida no meio ao dia 7 (Figura 35).



**Figura 34 - Ensaio de viabilidade celular em células pré-osteoblásticas MC3T3 expostas durante 7 dias aos pós TCP-Fe – estudo do efeito do teor de ferro, do estado de oxidação do ião ferro precursor e da temperatura de calcinação.**

A Figura 34 apresenta os resultados dos primeiros 7 dias do período de proliferação celular da linha de pré-osteoblastos MC3T3 após a sua exposição aos pós TCP-Fe. Foi avaliado o efeito do teor de ferro nos pós, do estado de oxidação do ião ferro precursor e da temperatura de calcinação nas células.

Relativamente à avaliação do teor de ferro na composição dos fosfatos de cálcio a dopagem aumentou o número de células metabolicamente viáveis relativamente ao pó de  $\beta$ -TCP não dopado. Este facto verificou-se desde o primeiro dia de incubação, mantendo-se com essa mesma tendência até ao último dia de ensaio. Com o aumento do teor de ferro até à concentração molar de 7 mol.%, a viabilidade celular tende a aumentar, diminuindo depois para teores de ferro de 10 mol.%. São de destacar os resultados obtidos pelos pós TCP3Fe<sup>2+</sup> e TCP7Fe<sup>2+</sup> que acompanham a tendência do controlo, especialmente este último que iguala as células controlo ao dia 3. Apesar dos resultados obtidos com o pó TCP10Fe<sup>2+</sup> terem apresentado uma resposta melhor que o TCP0Fe, e um perfil de proliferação coerente com a tendência das células controlo, denotam um decréscimo nas células viáveis relativamente às concentrações molares de ferro 3 mol.% e 7 mol.%.

Os pós TCP-Fe<sup>3+</sup> mostraram perfis proliferativos que acompanharam os das células controlo, mas ligeiramente melhores que os perfis dos pós obtidos com



Fe<sup>2+</sup>. A tendência da diminuição da percentagem de células com o aumento do teor de ferro foi mantida como no caso anterior, indicando que para concentrações molares acima de 7 mol.% a resposta de viabilidade/proliferação nos pré-osteoblastos tenderá a decair.

Para o mesmo teor de ferro, os pós submetidos a 1100°C exibiram uma diminuição no número de células viáveis relativamente aos submetidos a 1000°C. O aumento da temperatura tornou as partículas mais coesas e, conseqüentemente menos solúveis, o que poderá implicar um atraso na resposta proliferativa. Seguindo a mesma tendência dos pós calcinados a 1000°C, estes também apresentam um aumento proliferativo com o aumento dos dias de incubação.

Na Figura 35 é apresentada a atividade da fosfatase alcalina no meio recolhido ao dia 7 e a sua absorvância foi medida no comprimento de onda 405 nm. Sendo esta enzima tão importante no processo de mineralização óssea, a avaliação da mesma pode ser indicativa da atividade dos osteoblastos.

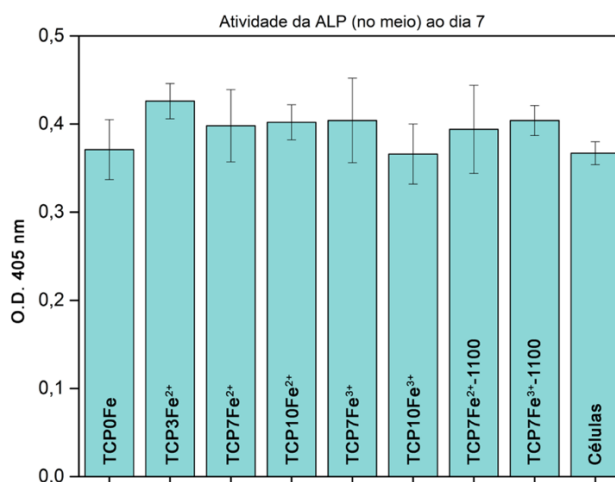


Figura 35 - Medida atividade da fosfatase alcalina (ALP) no meio de cultura ao dia 7 de ensaio das células MC3T3 expostas aos pós TCP-Fe.

A ALP presente no meio de cultura ao 7º dia de incubação mostra-se tendencialmente mais elevada nas amostras dopadas do que no controlo, com exceção do TCP0Fe e do TCP10Fe<sup>3+</sup>. O TCP0Fe, que mostrou resultados de viabilidade e proliferação celular muito mais baixos relativamente a todos os pós dopados, apresentou uma atividade de ALP não esperada, possivelmente devido aos iões de cálcio e fósforo presentes no β-TCP que propiciam a formação da

matriz óssea precocemente. Isto poderá implicar uma atividade de ALP alta com mineralização prematura e maturação incompleta da matriz, acarretando uma densidade óssea menor. Contudo, a recolha da ALP feita no meio só mostra uma atividade residual da enzima. A maior parte da ALP está nas células, pelo que para ter uma ideia mais correta da sua atividade será necessário fazer uma avaliação aos lisados de células.

## 2.4. Conclusões

As principais conclusões que se podem tirar deste estudo são as seguintes:

- Concentrações de Ferro superiores a 3 mol.% na dopagem de pós de  $\beta$ -TCP origina a formação maioritária da fase cristalina  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ . Quando o ião Ferro não consegue entrar na totalidade na rede cristalográfica do  $\beta$ -TCP tem tendência a formar hematite como segunda fase.
- Para a mesma concentração molar de ião ferro, a utilização do ião precursor  $\text{Fe}^{3+}$  origina a formação de maiores quantidades de hematite como segunda fase, devendo-se ao facto da valência 3+ do ferro não ocupar todos os sítios do cálcio (com valência 2+), formando lacunas na rede cristalina, ficando ferro livre em solução que oxida na fase hematite.
- O tamanho médio e distribuição de tamanhos de partícula varia de acordo com o ferro precursor usado (II ou III), tendo uma tendência a originar partículas maiores quando é usado o  $\text{Fe}^{3+}$  como precursor.
- Para a mesma concentração de Ferro e estado de oxidação do ião precursor, o aumento da temperatura de calcinação de 1000°C para 1100°C provoca um aumento no tamanho de partícula dos pós.
- Os pós TCP-Fe apresentaram comportamentos aparentemente antiferromagnéticos com um aumento da magnetização (a 40 000 Oe) à medida que aumento o teor de ferro na dopagem dos pós.

## **Capítulo 3 – Obtenção e caracterização de cimentos injetáveis**



### 3.1. Enquadramento teórico

A obtenção de um cimento injetável à base de fosfatos de cálcio, para preenchimento de defeitos ósseos com propriedades: (1) magnéticas, para melhorar o seu desempenho biológico e/ou (2) magnetotérmica, para eliminar possíveis células residuais por hipertermia, apresenta-se ser um grande desafio.

Ainda são poucos os trabalhos encontrados na literatura relacionados com este tema. Um estudo de Perez et al.<sup>15</sup> mostrou que, a incorporação de 0.1% de nanopartículas magnéticas numa pasta cimentícia apatítica melhorou as propriedades mecânicas e biológicas do cimento endurecido. Vlad et al.<sup>82,95,96</sup> desenvolveram um cimento apatítico dopado com ferro com boa biocompatibilidade, sem sinais de inflamação, necrose ou outra reação adversa na interface cimento – osso. No entanto, as propriedades do cimento sob ação de campo magnético aplicado, nomeadamente a nível biológico e magnetotérmico, não foram avaliadas nestes trabalhos<sup>15,82,95,96</sup>. Por outro lado, um estudo feito por Chun-han Hou et al.<sup>97</sup> mostra que nanopartículas magnéticas à base de bruchite dopada com ferro provaram ser capazes de destruir células cancerígenas, sem danificar células normais, em estudos *in vitro* de hipertermia

Neste trabalho, pretende-se obter um cimento ósseo bruchítico com propriedades magnetotérmicas, partindo de (1) pós à base de CaP dopados com Ferro apresentados no Capítulo anterior e (2) tendo como referência o estudo de Singh et al.<sup>16</sup> que alega que pós com a fase cristalina  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  apresentam boas propriedades magnetotérmicas e boa viabilidade celular, indicando que o seu uso como precursor nos cimentos ósseos poderá ser de grande interesse. Trabalhos relativos ao desenvolvimento de cimentos injetáveis partindo desses pós não foram encontrados na literatura até ao momento.

Sendo um objetivo muito ambicioso e não existindo nenhum estudo de referência na literatura, a estratégia de obtenção do cimento passou por várias etapas, tais como, seleção dos pós precursores, razão molar entre precursores (CaP dopado com Ferro e MCPM) de forma a obter uma mistura reativa, composição do líquido de presa e razões líquido/pó. Ao longo das várias etapas, a seleção das melhores composições foi baseada em testes de tempos de presa das pastas cimentícias e injetabilidade, bem como análise por DRX das fases obtidas

nos cimentos endurecidos. Os cimentos finais foram também caracterizados por resistência à compressão, porosidade total, e microestrutura.

## **3.2. Procedimento experimental**

### **3.2.1. Preparação das pastas cimentícias**

Ao longo deste trabalho, as pastas cimentícias foram preparadas misturando, manualmente, uma fase sólida (pós de CaP + fosfato monocálcico monohidratado ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , MCPM) com uma fase líquida durante 1 minuto.

Este estudo iniciou-se usando como pó o TCP7Fe<sup>2+</sup>-1000, constituído maioritariamente por  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  (Figura 15 e Tabela 4 do Capítulo 2). Numa primeira abordagem foi misturado o pó com fosfato monocálcico monohidratado ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , MCPM), numa razão equimolar 1:1, e água como líquido de presa<sup>12</sup>, numa razão líquido pó (RLP) de 0,50 mL·g<sup>-1</sup>. Além de não se ter obtido cimento com esta composição, a quantidade de líquido necessária para molhar o pó foi elevada. Isto deve-se ao facto deste pó ser constituído por partículas porosas (Figura 20 do Capítulo 2) com elevada área superficial. Para evitar o uso de elevadas RLP que aumenta os tempos de presa e afeta negativamente as propriedades mecânicas<sup>50</sup>, o pó TCP7Fe<sup>2+</sup>-1000 foi submetido a um processo de calcinação a 1100°C, com o objetivo de diminuir a área superficial específica. A título de comparação, foram também calcinados à mesma temperatura (1100°C), os pós TCP0Fe-1000 e TCP3Fe<sup>2+</sup>-1000 (caracterizados no capítulo anterior), que serão posteriormente usados na composição das pastas cimentícias. Após calcinação, todos os pós foram sujeitos a moagem de forma a obter distribuições de tamanho de partícula similares entre eles. A caracterização destes pós foi realizada por difração de raios-X e análise quantitativa por refinamento de Rietveld, distribuição do tamanho de partícula e área superficial específica e ainda análise microestrutural por SEM, à semelhança dos pós caracterizados no Capítulo 2.

Não tendo sido possível obter um cimento usando uma razão equimolar de TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100/MCPM de 1:1 com razão líquido/pó = 0,30 mL·g<sup>-1</sup>, e tendo em conta que o peso molecular desta fase ( $M_w = 1081,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) é diferente do  $\beta$ -TCP, alterou-se a razão molar  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ /MCPM de 1:2, para tentar obter como produto final a bruchite. Sendo os produtos da reação entre  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  e MCPM

em meio aquoso desconhecidos, foi tida em consideração ao longo deste estudo a reação do  $\beta$ -TCP com o MCPM (equação 2, Capítulo 1 secção 1.3.), já conhecida da literatura<sup>13</sup>, e supondo que a fase  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  poderá ter um comportamento semelhante ao  $\beta$ -TCP, originando bruchite dopada com ferro como produto da reação.

Com razão molar  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7/\text{MCPM}$  de 1:2, água como líquido de presa e  $\text{RLP} = 0,30 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  foi possível obter um cimento, no entanto, os tempos de presa iniciais e finais obtidos foram demasiado longos ( $> 1 \text{ h } 30 \text{ min}$  e  $> 2 \text{ h } 30 \text{ min}$ , respetivamente), o que inviabiliza o uso deste cimento como substituto ósseo injetável (Capítulo 1, secção 1.3.1.).

Mantendo a razão  $\text{TCP}-7\text{Fe}^{2+}-1100/\text{MCPM}$  de 1:2, e após várias tentativas com líquidos de presa de diferentes composições, decidiu-se adicionar ao pó de partida ( $\text{TCP}7\text{Fe}^{2+}-1100$ ) uma pequena percentagem de um outro pó (cerca de 15%), designado por  $\text{HTCP}7\text{Fe}^{3+}-1100$ , não caracterizado nos estudos anteriores (Capítulo 2), dopado com a mesma percentagem molar de ião ferro, mas diferentes condições de síntese. Este pó foi também calcinado a  $1100^\circ\text{C}$  e sujeito ao mesmo processo de caracterização apresentado no ponto anterior (3.2.1).

A Tabela 7 resume as várias composições cimentícias estudadas nesta etapa, com diferentes razões (em massa) entre os diferentes componentes, usando água como líquido de presa e  $\text{RLP} = 0,30 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ .

**Tabela 7 – Composições cimentícias testadas com a adição do pó  $\text{HTCP}7\text{Fe}^{3+}-1100$ , com água como líquido de presa e uma razão líquido/pó de  $0,30 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ .**

<b>Composição (wt.%)</b>	
<b>1</b>	58,08% $\text{TCP}7\text{Fe}^{2+}-1100$ + 26,92% MCPM + 15% $\text{HTCP}7\text{Fe}^{3+}-1100$
<b>2</b>	49,74% $\text{TCP}7\text{Fe}^{2+}-1100$ + 35,26% MCPM + 15% $\text{HTCP}7\text{Fe}^{3+}-1100$
<b>3</b>	51,60% $\text{TCP}7\text{Fe}^{2+}-1100$ + 32,81% MCPM + 15,59% $\text{HTCP}7\text{Fe}^{3+}-1100$

Após a avaliação dos tempos de presa e as fases dos produtos da reação por DRX, foi selecionada a composição 3, denominada posteriormente de  $\text{HCPC}7\text{Fe}$ .

Uma vez que o cimento HCPC7Fe apresentou tempos de presa demasiado curtos para o seu uso ser viável numa abordagem clínica, o passo seguinte focou-se na procura de uma composição de líquido de presa capaz de aumentar os tempos de presa inicial e final para valores aceitáveis para a aplicação pretendida. Com base na literatura e, de modo a retardar a reação, foi feito um estudo dos tempos de presa com soluções aquosas de ácido cítrico com diferentes concentrações (AC, 2, 5 e 10 wt.%, HoneyWell/Fluka, Alemanha). Nos cimentos bruchíticos, os citratos funcionam como quelantes que se ligam ao cálcio e atrasam a reação de precipitação da bruchite.<sup>50</sup> Destes ensaios, foi selecionada a solução com 5 wt.% AC.

Para comparação foram também preparados cimentos a partir dos pós TCP0Fe<sup>2+</sup> e TCP3Fe<sup>2+</sup>. A Tabela 8 resume as composições das pastas cimentícias estudadas, para duas RLP de 0,24 e 0,30 mL.g<sup>-1</sup>. Todas as pastas foram posteriormente caracterizadas por tempos de presa inicial e final e injetabilidade (secção 3.2.3). Nos cimentos endurecidos foram avaliadas a resistência à compressão e fases cristalinas presentes nos cimentos antes e depois de 48 horas em PBS, porosidade e microestrutura (secção 3.2.4).

**Tabela 8 - Composições das diferentes pastas cimentícias estudadas com ácido cítrico como líquido de presa e uma razão líquido/pó de 0,24 e 0,30 mL.g<sup>-1</sup>.**

Nomenclatura	Composição (wt.%)	RLP (mL.g <sup>-1</sup> )	
<b>CPC0Fe</b>	55,17% TCP0Fe + 44,83% MCPM	-	0,30
<b>CPC3Fe</b>	55,17% TCP3Fe <sup>2+</sup> -1100 + 44,83% MCPM	0,24	0,30
<b>CPC7Fe</b>	68,33% TCP7Fe <sup>2+</sup> -1100 + 31,67% MCPM	-	0,30
<b>HCPC7Fe</b>	51,60% TCP7Fe <sup>2+</sup> -1100 + 32,81% MCPM + 15,59% HTCP7Fe <sup>3+</sup> -1100	0,24	0,30



A Figura 36 apresenta um esquema resumo das diferentes etapas do procedimento experimental deste estudo.

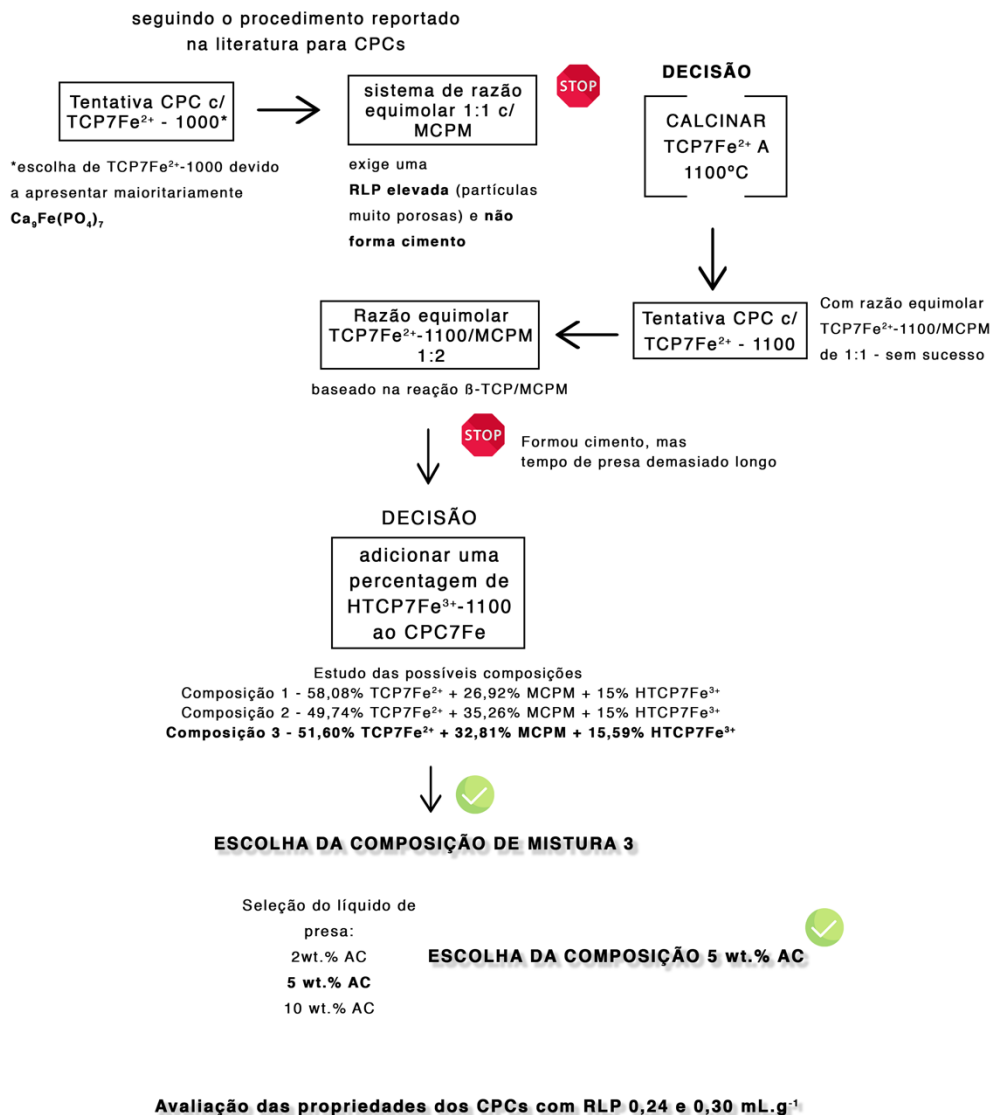
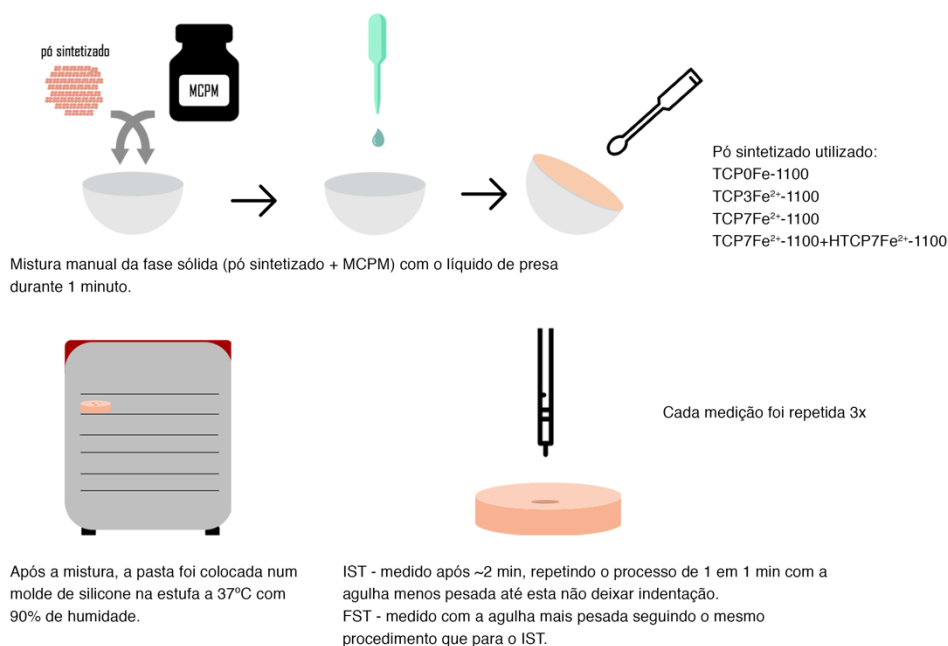


Figura 36 – Resumo das várias etapas do procedimento experimental.

### 3.2.2. Caracterização das pastas cimentícias

#### Tempo de presa

O tempo de presa das pastas foi avaliado segundo a norma ASTM-C266-89, pelo método das agulhas de Gillmore.<sup>13</sup> A Figura 37 apresenta esquematicamente o procedimento realizado para a medição dos tempos de presa dos CPCs.

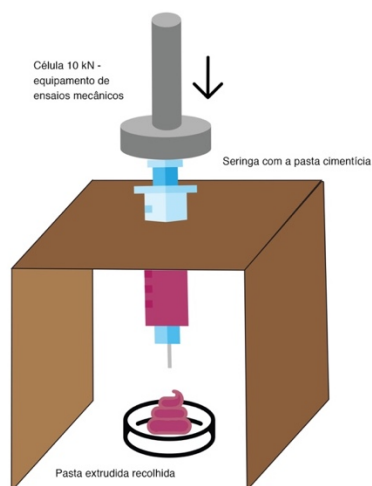


**Figura 37 - Esquema do procedimento seguido para a medição dos tempos de presa inicial e final dos CPCs.**

Após a medição dos IST e FST, o cimento foi retirado do molde, interrompendo imediatamente a reação de presa colocando acetona ( $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ , Panreac, Espanha) e triturando-o. Seguidamente, a mistura resultante foi seca em estufa a 37°C durante 24 horas, de forma a verificar e quantificar as fases cristalinas resultantes deste processo.

### Injetabilidade

De modo a avaliar a capacidade de injetabilidade das pastas cimentícias foram tidos em conta os procedimentos realizados em alguns trabalhos anteriores.<sup>14,68,69</sup> A pasta de cada composição foi obtida por mistura manual durante 1 minuto, de acordo com o procedimento anteriormente explicado, e colocada no interior de uma seringa de 5 mL com ~13 mm de diâmetro interior e ~60 mm comprimento, seguindo-se a pesagem do conjunto. A seringa foi colocada num aparato para a manter fixa na vertical, colocando o conjunto no equipamento de ensaios mecânicos (Shimadzu Autograph, Japão) – como está esquematizado na Figura 38.



**Figura 38 - Esquema do aparato utilizado para os ensaios de injetabilidade dos CPCs.**

A extrusão das pastas iniciou-se após 3 minutos da mistura dos vários componentes, com uma velocidade de  $15 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  e uma força máxima de 100 N (força máxima atingida manualmente).<sup>98</sup> A percentagem de pasta extrudida, ou injetabilidade, foi calculada de acordo com a equação (5)<sup>14</sup>:

$$\text{Injetabilidade (\%)} = \frac{\text{massa de pasta extrudida da seringa}}{\text{massa de pasta inserida inicialmente na seringa}} \times 100 \quad (5)$$

O procedimento foi repetido 3 vezes para cada pasta e foi calculada uma percentagem de injetabilidade média.

### **3.2.3. Caracterização dos cimentos endurecidos**

#### Resistência à compressão

Para avaliar a resistência à compressão dos vários cimentos, foram preparados provetes cilíndricos (diâmetro de 6 mm e altura 12 mm), vertendo as pastas cimentícias em moldes metálicos. Os moldes foram colocados numa estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 90% de humidade, durante 1 hora e 30 minutos. Os cilindros foram mergulhados numa solução salina tampão (PBS – 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 80,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 19,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) durante 48 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Todos os cilindros foram submetidos ao ensaio de compressão no equipamento Shimadzu Autograph (Japão), com uma célula de carga de 10 kN e uma velocidade de compressão de  $1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### Análise semi-quantitativa de fases – Método RIR

A composição de fases cristalinas de cada cimento com as diferentes RLP foi obtida por difração de raios-X no difratômetro PANalytical X'Pert. O modo de aquisição de dados foi contínuo e com rotação, num intervalo de varrimento ( $2\theta$ ) de 4 a  $70^\circ$  com uma largura de passo de  $0,0131^\circ 2\theta \text{ s}^{-1}$ . A análise semi-quantitativa das fases cristalinas presentes em cada amostra foi realizada no software (HighScore Plus) associado ao equipamento pelo método RIR – *Reference Intensity Ratio*. Para analisar as fases em estudo, este método utiliza as intensidades relativas da amostra em relação às intensidades das fases-padrão.<sup>99</sup>

Os números ICDD utilizados para a análise dos cimentos foram: #04-006-9376 para o  $\beta$ -TCP, #04-011-5377 para o MCPM, #04-008-4393 para  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ , #04-013-3344 para a bruchite e #04-009-3755 para a monetite.<sup>14</sup>

### Porosidade total, densidade real e densidade aparente

A **porosidade total** ( $P_{\text{total}}$ , vol.%) é a soma da porosidade aberta e da porosidade fechada, no caso de coexistirem ambas no mesmo material. A porosidade aberta apresenta-se sob a forma de poros interconectados entre si e também com a superfície formando uma rede contínua. A porosidade fechada consiste nos poros isolados uns dos outros, rodeados pelo material.<sup>100</sup> Assim, a porosidade total é a razão entre o volume total dos poros e o volume aparente da amostra.

A porosidade total foi calculada pela equação 7<sup>100</sup>:

$$P_{\text{total}} = \frac{V_{\text{total de poros}}}{V_{\text{aparente}}} \times 100 = \frac{V_{\text{aparente}} - V_{\text{real}}}{V_{\text{aparente}}} \times 100 \quad (6)$$

Substituindo  $V = \frac{m}{d}$ , vem:

$$P_{\text{total}} = \frac{d_{\text{real}} - d_{\text{aparente}}}{d_{\text{real}}} \cdot 100 \quad (7)$$

Em que  $d_{\text{aparente}}$  é a **densidade aparente** - razão entre a massa e o volume aparente da amostra e  $d_{\text{real}}$  é a **densidade real** - razão entre a massa e o volume real do material (diferença entre o volume aparente e o volume total de poros). Neste trabalho, em vez da densidade real ( $d_{\text{real}}$ ) das CPCs foi considerada a sua

**densidade teórica** e esta foi calculada através da densidade teórica de cada fase cristalina presente no cimento, consoante as suas percentagens (em peso). Estas foram determinadas por DRX pelo método RIR.

#### *Densidade aparente*

A medição da densidade aparente dos cimentos foi efetuada através do método de imersão no mercúrio que, à semelhança da técnica usada para medir a densidade real, se baseia no princípio de Arquimedes.<sup>100</sup>

O mercúrio (Hg) é um metal líquido que, com a maior parte dos sólidos, possui um ângulo de contacto entre 110° e 140°,<sup>101-103</sup> não se infiltrando nos poros das amostras sem aplicação de pressão. Ou seja, o provete imerso no mercúrio fica sujeito à força de impulsão (I) que contraria o peso da amostra (P<sub>a</sub>) e a força necessária para manter o provete imerso (F<sub>i</sub>), como representado na Figura 39<sup>100,104</sup>:

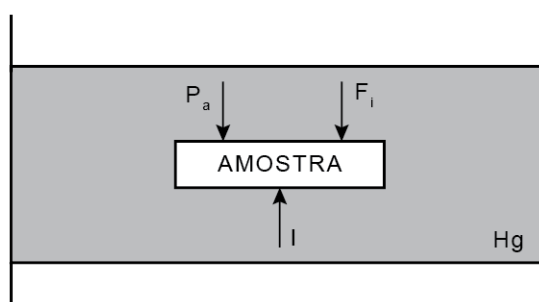


Figura 39 - Esquema representativo das forças que atuam na amostra na medição de densidade aparente pelo método de imersão em mercúrio (adaptado de <sup>100</sup>).

Pela definição, a densidade aparente é calculada pela razão entre a massa da amostra e o respetivo volume aparente, como é demonstrado na equação:

$$\rho_{ap} = \frac{m_a}{V_{ap}} \quad (8)$$

Para a realização da medição da densidade aparente dos diferentes cimentos, as amostras foram secas durante alguns dias numa estufa a 37°C e pesadas (m<sub>a</sub>), seguindo-se a medição da densidade aparente num densímetro de mercúrio concebido em laboratório (Figura 40).



**Figura 40 - Densímetro de mercúrio para sólidos.**

Para a realização deste ensaio, foram usados 5 provetes (duas medidas para cada um) de cada composição de cimento testado, e o valor da sua densidade aparente resultante da média de valores obtidos dos cinco provetes.

#### Análise microestrutural - Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

A análise da microestrutura dos diferentes cimentos foi feita por microscopia eletrônica de varrimento (SEM, Hitachi S-4100, Tóquio, Japão), com um aceleração de 25 kV e diferentes resoluções.

Para a visualização das amostras dos diferentes CPCs e respetivo mapeamento dos elementos Ca, P e Fe, cada cimento foi quebrado e utilizou-se um pedaço para visualizar a sua microestrutura à fratura. Cada pedaço foi fixado no porta-amostras com cola de carbono e deixado a secar na estufa a 40°C durante 24 horas. Foi depositado um filme de carbono recorrendo ao equipamento Emitech K950.

#### Medição da magnetização (SQUID) e de capacidade hipotérmica

As medidas foram realizadas num dispositivo supercondutor de interferência quântica, num magnetómetro SQUID MPMS 3, variando o campo magnético no intervalo [-40000,40000] Oe, à temperatura ambiente (300 K). A hipotermia foi medida no equipamento DM100 Series (Nanoscale biomagnetics), com a aplicação de uma frequência de 337 kHz e uma amplitude de 20 mT, colocando cada amostra no centro de uma bobina.

### 3.3. Resultados e discussão

#### Caraterização dos precursores dos CPCs

Na Figura 41 são apresentados os difratogramas de raios-X dos pós de TCP- Fe calcinados a 1100°C, com uma largura de varrimento entre 20° e 45°, bem como as fichas PDF das fases cristalinas utilizadas para a identificação das fases que se encontram presentes nos pós. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados da análise quantitativa das fases cristalinas presentes nos pós, obtidos pelo método de refinamento de Rietveld.

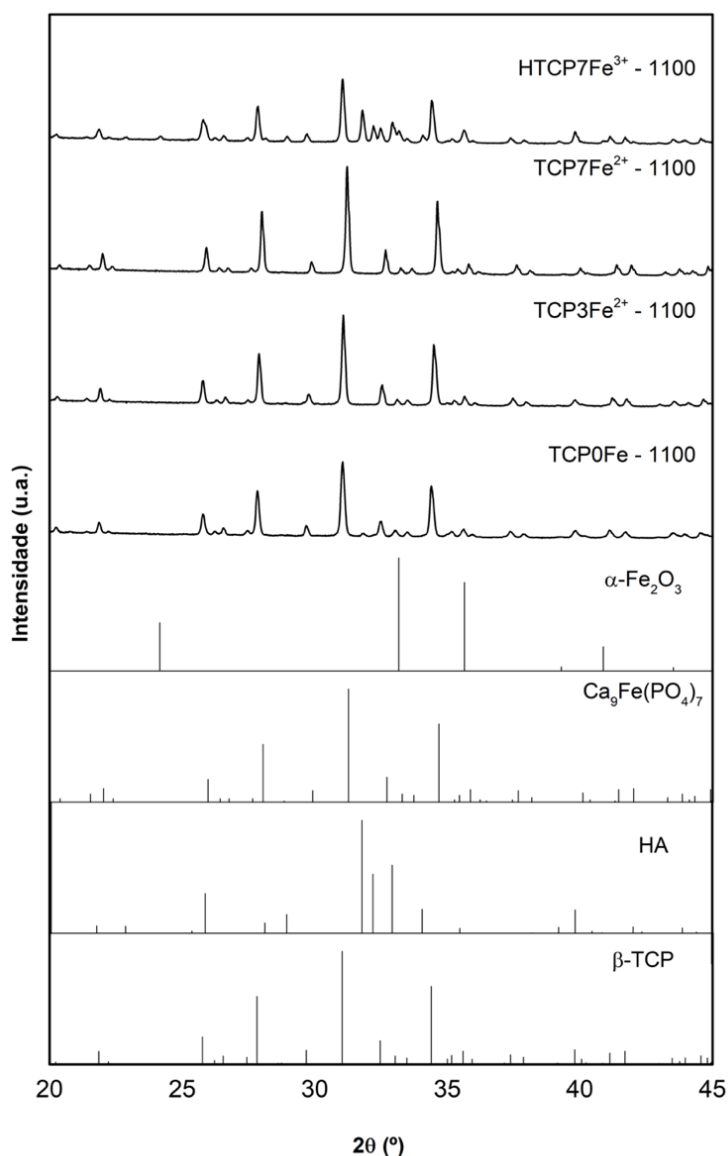


Figura 41 - Difratogramas de raios X dos pós TCP-Fe e HTCP7Fe<sup>3+</sup> calcinados a 1100°C, usados nas formulações dos cimentos testados e as respetivas fichas PDF utilizadas para a identificação das fases presentes: 04-006-9376 (β-TCP), 04-015-7245 (HA), 04-008-4393 [Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub>] e 04-007-9266 (α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

Tabela 9 - Análise quantitativa de fases cristalinas obtida por refinamento de Rietveld dos pós (calcinados a 1100°C) usados nas diferentes formulações de CPCs.

Amostra	Quantificação das fases – método de Rietveld (wt.%)				
	$\beta$ -TCP	HA	CPP	$\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$
TCP0Fe - 1100	96,6	-	3,4	-	-
TCP3Fe <sup>2+</sup> - 1100	98,0	-	2,0	-	-
TCP7Fe <sup>2+</sup> - 1100	28,2	-	-	71,8	-
HTCP7Fe <sup>3+</sup> - 1100	68,0	27,0	-	-	5,0

Como seria de esperar, a calcinação a 1100°C não altera significativamente as fases cristalinas presentes nos pós, comparativamente aos pós calcinados a 1000°C, apresentados nas Tabelas 4 e 5 da secção 2.3.1. e 2.3.2., respetivamente. O pó TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100 apresenta como fase maioritária  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ , enquanto que nos restantes pós analisados a fase maioritária é o  $\beta$ -TCP. O pó HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100 além de  $\beta$ -TCP (68,008 wt.%) tem cerca de 27 wt.% de hidroxiapatite e 5 wt.% de hematite.

A moagem destes pós calcinados a 1100°C foi realizada com o objetivo de obter distribuições do tamanho de partícula semelhantes entre eles. É conhecido da literatura que a redução do tamanho de partícula e uma distribuição alargada de partículas favorecem a injetabilidade das pastas de CPC<sup>105</sup>, pelo que a moagem realizada teve como objetivo a obtenção de um tamanho médio de partícula cerca de  $\sim 1,500 \mu\text{m}$ . Após a moagem, os pós foram peneirados a  $40 \mu\text{m}$  e as curvas resultantes de distribuição do tamanho de partículas (DTP) dos pós, juntamente com uma tabela com os valores  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ,  $D_{\text{médio}}$  e SSA estão apresentadas na Figura 42.



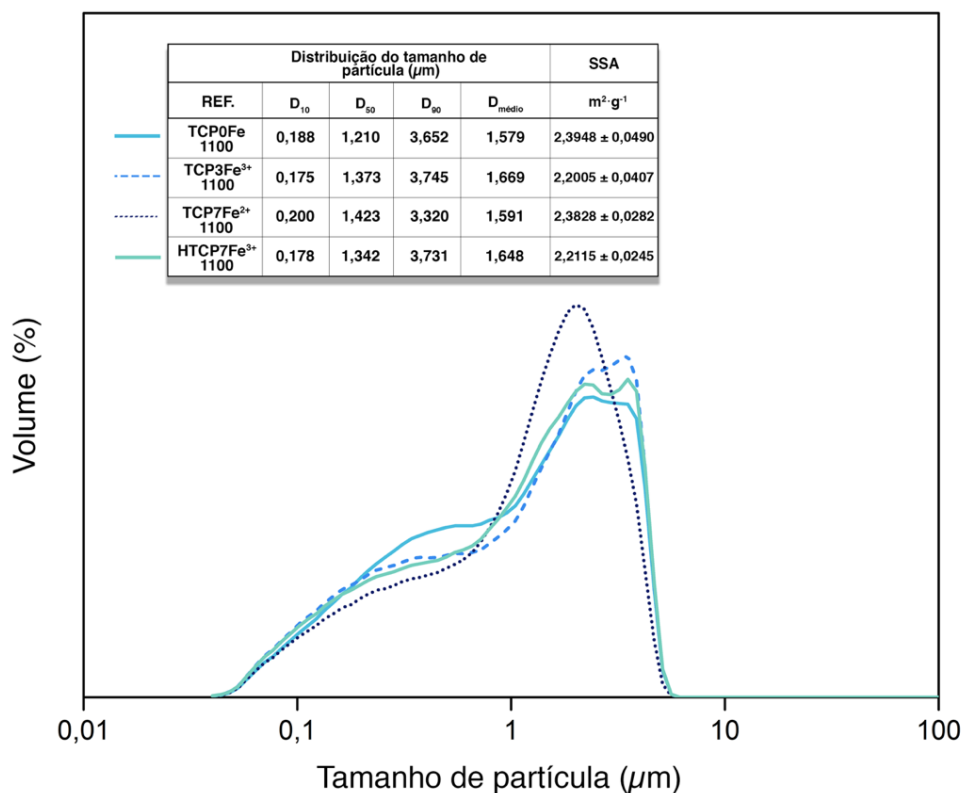
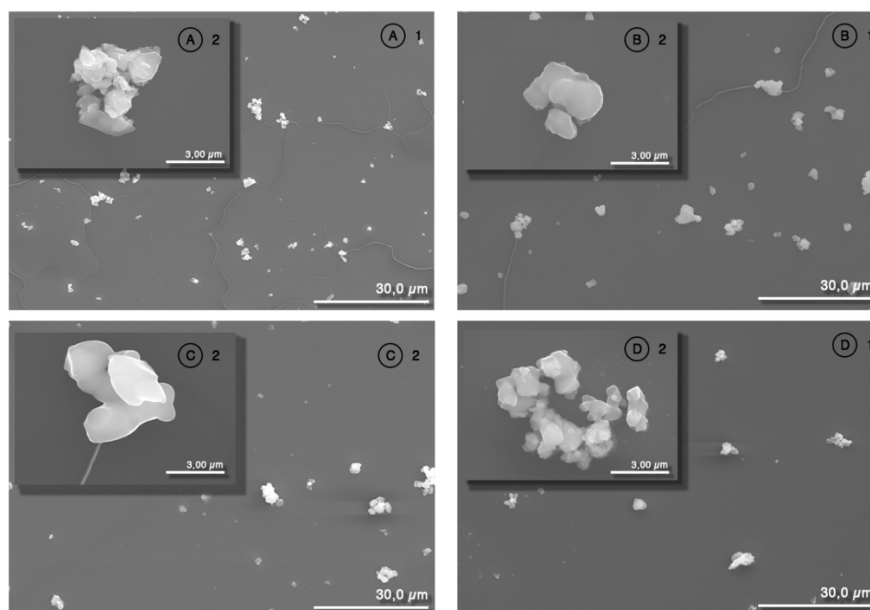


Figura 42 - Distribuição do tamanho de partícula dos pós obtidos após moagem e peneirados a  $40 \mu\text{m}$ .

As curvas DTP de todos os pós apresentam uma distribuição semelhante entre si – alargada, com uma população predominante de partículas maiores, centrada em  $\sim 2,5 \mu\text{m}$ , e uma população de partículas menores centrada em  $\sim 0,5 \mu\text{m}$ . Os tamanhos médios de partícula são semelhantes para todos os pós, com valores entre  $1,579 \mu\text{m}$  e  $1,669 \mu\text{m}$ . O  $D_{90}$  - que expressa que 90% das partículas estão abaixo do valor obtido – de todos os pós também é semelhante entre eles, com um valor próximo de  $\sim 3,6 \mu\text{m}$ .

A Figura 43 mostra a morfologia dos diferentes pós obtida por microscopia eletrônica de varrimento (SEM). As micrografias menos ampliadas mostram os agregados de partículas (1) e as mais ampliadas (2) mostram um detalhe dos mesmos.

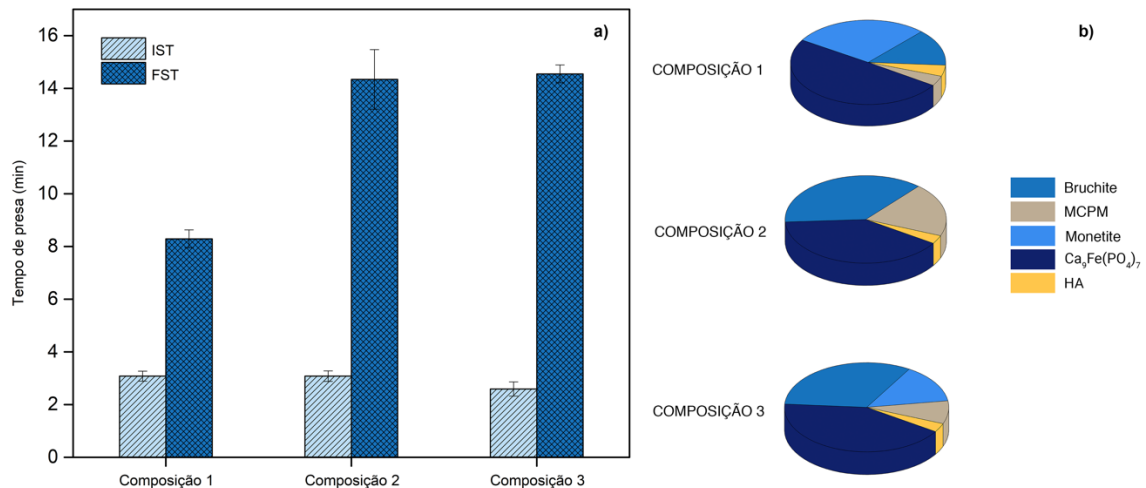


**Figura 43 - Micrografias obtidas por SEM dos pós selecionados para as diferentes formulações de CPCs, após moagem e peneiração: A – TCP0Fe-1100; B – TCP3Fe<sup>2+</sup>-1100; C – TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100; D – HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100.**

As imagens apresentadas servem de suporte às curvas DTP apresentadas na Figura 42, onde se podem ver partículas e agregados de partículas pequenos resultantes da moagem dos pós. Com o tratamento térmico a 1100°C, as partículas primárias fundiram-se formando partículas mais coesas, isto é, menos porosas quando comparadas com os pós calcinados a 1000°C (Figuras 20 e 25, secção 2.3.1). Os pós TCP3Fe<sup>2+</sup>-1100 e TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100, apresentam partículas mais redondas e com uma superfície menos rugosa do que os pós TCP0Fe-1100 e HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100.

#### Caraterização das pastas cimentícias

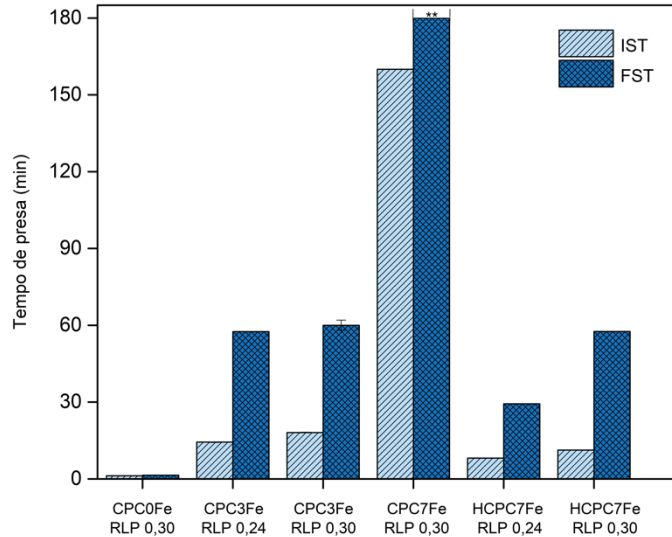
A Figura 44 apresenta os resultados dos tempos de presa inicial e final (Figura 44a) das várias composições apresentadas na Tabela 7 (secção 3.2.1) respetivas fases cristalinas obtidas por DRX e quantificadas pelo método RIR.



**Figura 44 - a)** Tempos inicial (IST) e final (FST) das formulações de CPCs contendo diferentes proporções de TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100, MCPM e HTCP7Fe-1100, usando água como líquido de presa numa RLP de 0,30 mL.g<sup>-1</sup>; **b)** Fases cristalinas das várias composições. **Composição 1:** 58,08% TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100 + 26,92% MCPM + 15% HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100, **Composição 2:** 49,74% TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100 + 35,26% MCPM + 15% HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100 e **Composição 3:** 51,60% TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100 + 32,81% MCPM + 15,59% HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100.

Todas as composições apresentam tempos de presa inicial semelhantes (cerca de 3 min). O tempo de presa final é semelhante nas composições 2 e 3 (cerca de 14 min) e ligeiramente inferior para a composição 1 (8 min). Além dos tempos de presa, os produtos da reação de presa (composição dos cimentos endurecidos) são muito importantes na escolha da formulação dos pós precursores e da fase líquida. Através dos gráficos circulares da Figura 44b, que apresenta as fases cristalinas quantificadas pelo método RIR dos cimentos após atingir o FST, é possível observar que em nenhuma das formulações a reação de presa foi totalmente completa – ou seja, o produto final teria de ser 100% bruchite e/ou monetite. A seleção da composição para prosseguir para os estudos seguintes, foi feita com base na maior quantidade de bruchite + monetite presente nos CPCs resultantes, ou seja, a **composição 3:** 51,60% TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100 + 32,81% MCPM + 15,59% HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100, denominada seguidamente de **HCPC7Fe** (Tabela 7).

A Figura 45 apresenta os tempos de presa, IST e FST, para as diferentes formulações apresentadas na Tabela 8 (secção 3.2.1) usando uma solução de 5 wt% AC como líquido de presa em diferentes RLP.



**Figura 45 - Tempos inicial (IST) e final (FST) das diferentes formulações de CPCs com diferentes RLP; (\*\*\*) FST não contabilizado, sendo bastante superior a 180 min.**

Para a mesma RLP, verifica-se que os tempos de presa IST e FST, aumentam com o aumento da concentração de íão Ferro nos pós precursores dos CPCs, atingindo valores muito elevados para a composição CPC7Fe. A adição do pó HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100 a esta composição (HCPC7Fe) originou uma diminuição significativa do IST e FST para a mesma RLP. Estes resultados podem ser explicados pelas fases cristalinas presentes nos pós precursores. No pó TCP7Fe<sup>2+</sup>- 1100, que contém 72 wt.% da fase Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub> e apenas 28 wt.% de β-TCP a reatividade com o MCPM é reduzida, diminuindo a velocidade da reação de presa. Adicionando a este precursor o pó HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100, que não contém a fase Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub>, mas essencialmente β-TCP e HA, a reatividade com o MCPM aumenta, acelerando a reação de presa e, conseqüentemente diminuindo o IST e FST.

Para um RLP de 0,30 mL·g<sup>-1</sup>, as formulações CPC3Fe, CPC7Fe e HCPC7Fe apresentaram um tempo de presa final bastante elevado, não adequada para a aplicação pretendida. Diminuindo a RLP para 0,24 mL·g<sup>-1</sup> verificou-se uma diminuição do IST e FST para a composição HCPC7Fe, como seria de esperar, embora não se tenha verificado o mesmo para o CPC3Fe. As composições CPC0Fe e CPC7Fe não foram consideradas nos ensaios seguintes, por apresentarem tempos de presa demasiado curtos (não permitindo o manuseamento do cimento) e demasiado longos, respetivamente.

As formulações de cimento CPC3Fe e HCPC7Fe com as duas razões líquido/pó foram testadas em ensaios de injetabilidade (Figura 46).

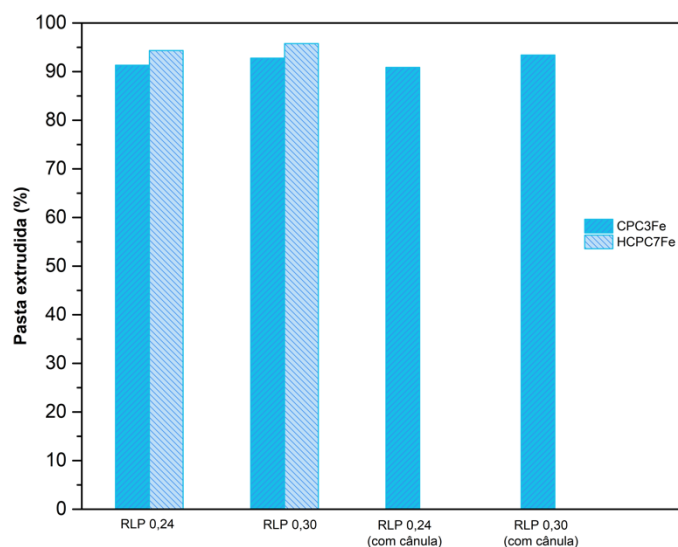


Figura 46 - Percentagem de pasta extrudida em função da RLP para as composições cimentícias CPC3Fe e HCPC7Fe.

A capacidade de injetabilidade das pastas cimentícias é apresentada pela percentagem de pasta extrudida em função da razão líquido/pó. Observa-se que as formulações cimentícias testadas são praticamente todas injetáveis, uma vez que apresentam valores de percentagem de pasta extrudida acima de 90-95%, e que os restantes 5-10% correspondem à pasta que fica no bico da seringa (cerca de 5%) ou dentro da cânula (cerca de 10%, caso CPC3Fe) após o ensaio completo. No entanto, a injetabilidade nas pastas com  $RLP = 0,30 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  aparenta ser ligeiramente superior quando comparadas com as pastas com  $RLP = 0,24 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , facto explicável pelo facto de se tratar de um % ponderal e não volúmica, e que apesar do volume de pasta remanescente na seringa ser igual, estas apresentam uma densidade diferente. Também se verifica que a formulação de cimento HCPC7Fe tem o melhor resultado de injetabilidade, com ~96% de pasta extrudida. Os ensaios com cânula foram realizados de forma a tentar simular uma situação de injetabilidade real. Foi apenas testada com a pasta CPC3Fe, uma vez que nesta fase do trabalho o pó precursor TCP7Fe-1100 já não era suficiente para todos os testes.

## Caraterização dos CPCs

Os cimentos endurecidos foram avaliados após 48 horas de imersão em PBS. Foram feitas medidas de resistência à compressão a húmido, avaliação da porosidade e das fases cristalinas presentes. Na Figura 47 (a-c) apresentam-se os respetivos resultados.

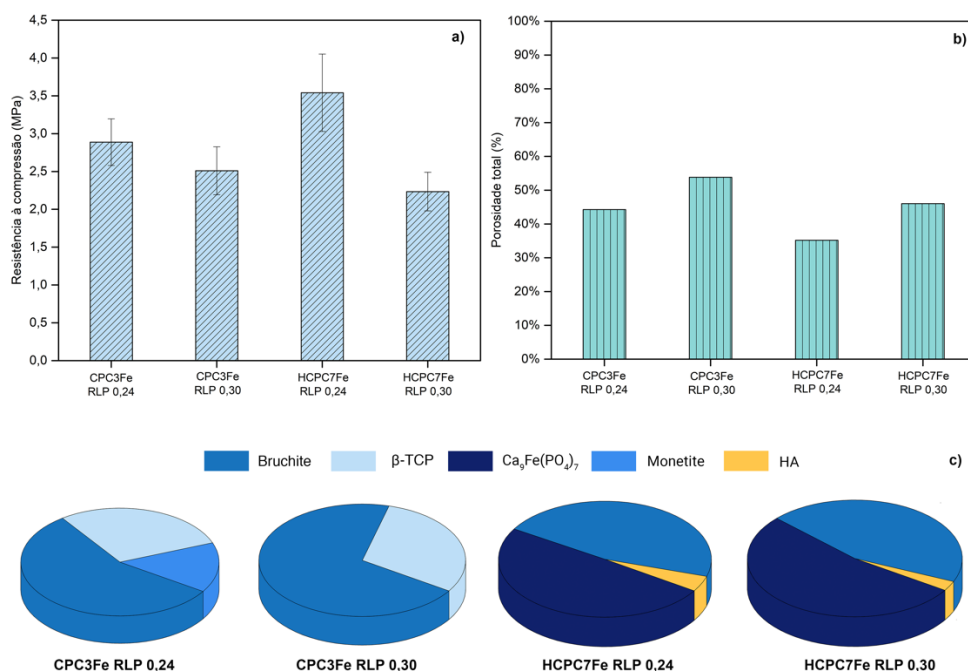


Figura 47 - (a) Resistência à compressão b) percentagem de porosidade e (c) fases cristalinas das diferentes composições de CPC com RLP= 0,30 e 0,24 mL·g<sup>-1</sup>, após 48 horas em PBS.

Os baixos valores de resistência à compressão a húmido dos cimentos bruchíticos têm sido alvo de investigação, uma vez que é uma das características importantes para a sua aplicação clínica, em locais sujeitos a cargas mais elevadas. Os valores médios de resistência à compressão (Figura 47a) para os cimentos apresentados, após 48 horas de imersão em PBS, encontram-se numa gama de valores entre 2,3-3,54 MPa. Para a mesma composição, a diminuição da RLP de 0,30 para 0,24 mL·g<sup>-1</sup> leva a um aumento dos valores de resistência à compressão como era esperado. A composição que apresentou melhores resultados de RC foi a HCPC7Fe com RLP de 0,24 mL·g<sup>-1</sup>. Estes resultados estão em concordância com os valores da porosidade apresentados na Figura 47 (b). Os CPCs obtidos com RLP inferior (0,24 mL·g<sup>-1</sup>) apresentam percentagens de porosidade total inferior quando comparados com os CPCs obtidos com RLP superior (0,30 mL·g<sup>-1</sup>). O CPC

que apresentou melhores valores de RC (HCPC7Fe) apresenta cerca de 30% de porosidade total.

Relativamente às fases cristalinas formadas (Figura 47c) é possível verificar que, para a mesma composição de CPC, a variação da RLP não alterou significativamente a natureza e quantidades de fases presentes. A composição CPC3Fe apresenta maioritariamente bruchite como produto da reação e  $\beta$ -TCP por reagir para uma RLP 0,30 mL.g<sup>-1</sup>. Para uma RLP 0,24 mL.g<sup>-1</sup>, aparece também a monetite como produto da reação além da bruchite por escassez de fase líquida.<sup>50</sup> A composição HCPC7Fe apresenta bruchite como produtos da reação, com HA e quantidades significativas de Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub> por reagir.

Apesar dos valores de resistência à compressão obtidos não serem muito elevados estão na gama de valores de resistência à compressão do osso trabecular.<sup>23</sup> Vários fatores podem estar na origem dos resultados obtidos para esta propriedade, tais como, reação de presa incompleta, mau empacotamento de partículas e falta de coesão da pasta. Para otimizar e melhorar estes parâmetros seria necessário efetuar um estudo mais aprofundado na seleção de líquidos de presa e distribuição granulométrica dos pós de partida.

A microestrutura dos cimentos foi observada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). A Figura 48 apresentada as micrografias das superfícies à fratura das diferentes formulações de cimento (CPC3Fe e HCPC7Fe) com as duas RLP estudadas. Apresentam-se também micrografias de um CPC obtido com  $\beta$ -TCP puro (CPC0Fe) a título de comparação.

Todos os cimentos mostram cristais semelhantes a placas, interligadas entre si, correspondentes à bruchite, de acordo com os resultados obtidos na semi-quantificação de fases, presente na Figuras 47c. Nos cimentos clássicos de Brown-Chow, os cristais tipo pétala ou agulha crescem de forma epitaxial, isto é, os cristais de uma substância crescem sob os cristais de outra substância adquirindo a mesma orientação. Desta forma, são responsáveis pela interligação dos cristais de bruchite e pelo endurecimento do cimento.<sup>12</sup> Com o aumento da RLP, e para ambas as composições CPC3Fe e HCPC7Fe, os cristais de bruchite alteram-se para um aspeto alongado, em forma de agulha.

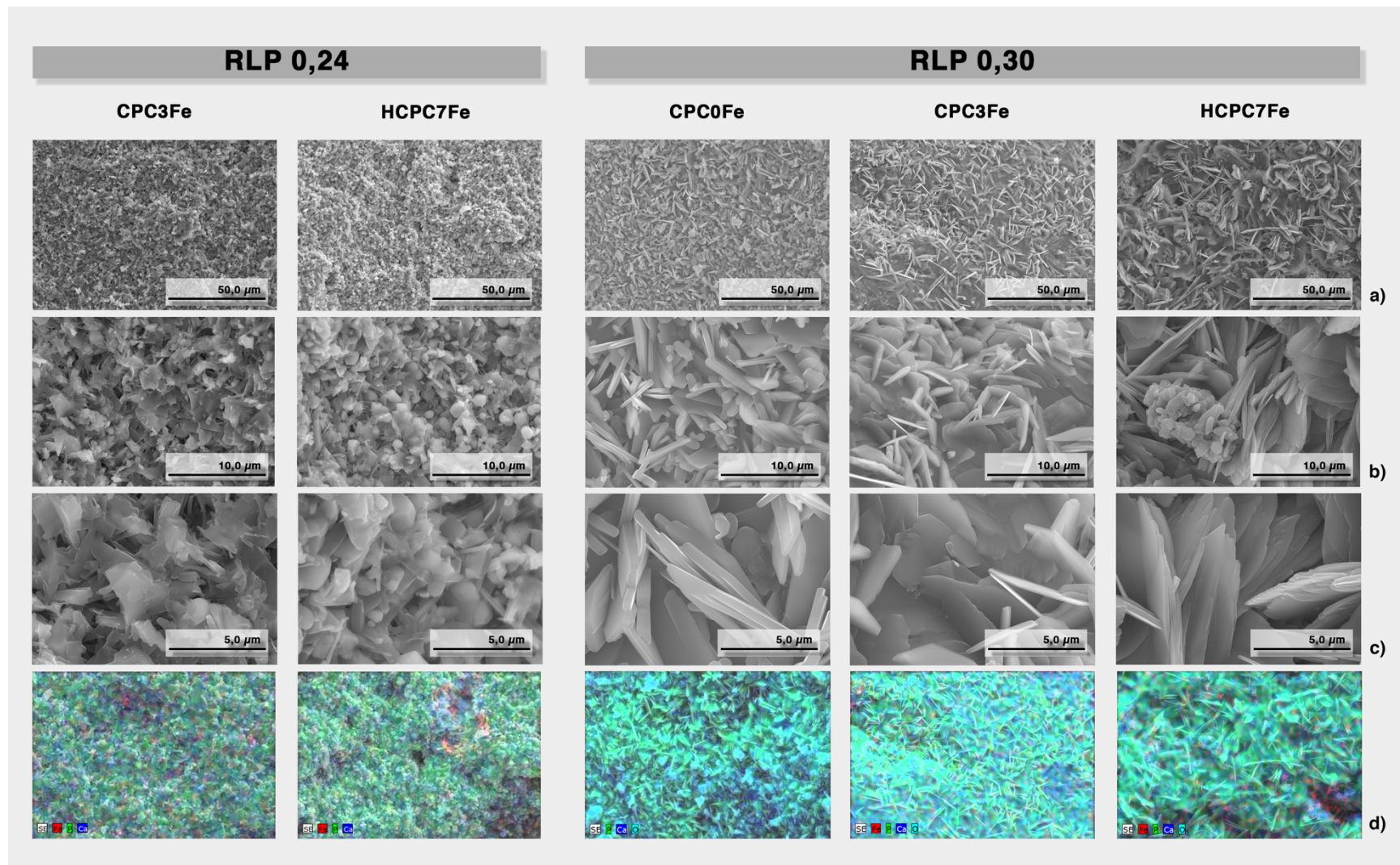


Figura 48 - Micrografias obtidas por SEM dos diferentes CPCs com RLP 0,24 e 0,30 mL·g<sup>-1</sup> com as ampliações a) x400; b) x1K; c) x10K; e respetivo mapeamento da superfície à fratura, d).



A presença de alguns cristais esféricos poderá corresponder aos precursores do cimento que não reagiram na totalidade. Para a RLP  $0,24 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , a amostra CPC3Fe apresenta porosidade superior e um menor empacotamento dos cristais formados quando comparada com a amostra HCPC7Fe, em concordância com os resultados obtidos para as propriedades mecânicas e porosidade (Figura 45 a e b).

A Figura 49 apresenta as curvas de magnetização em função do campo magnético para os cimentos obtidos com pós precursores dopados (HCPC7Fe) na ausência e na presença de 1 wt.% de nanopartículas de magnetite (Chemicell GmbH, Eresburgstrasse, Berlim, Alemanha, tamanho médio 50 nm). A título de comparação apresenta-se também a curva de magnetização de um cimento obtido com pós não dopados na presença da mesma quantidade de nanopartículas de magnetite (CPC0Fe+NPs). A adição de NPs foi feita com o intuito de melhorar a resposta magnética do cimento e verificar possíveis interações entre pós dopados e NPs, e foram adicionadas no cimento endurecido (transformado em pó com moagem manual em almofariz).

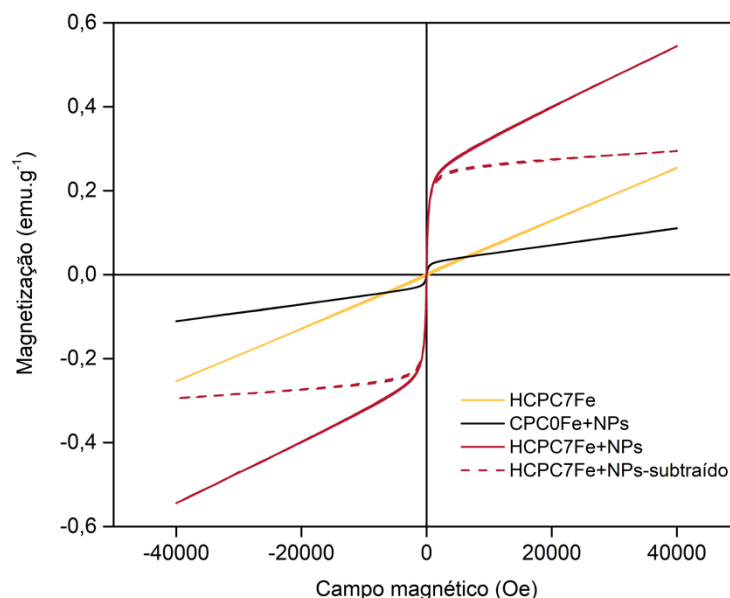


Figura 49 – Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado.

O comportamento magnético do cimento HCPC7Fe é semelhante ao comportamento do pó precursor ( $\text{TCP7Fe}^{2+}\cdot 1100$ , Figura 31, Capítulo 2), ou seja aparentemente anti-ferromagnético. A diminuição da magnetização a 40 000 Oe do

cimento HCPC7Fe relativamente ao pó de partida (TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100) era esperada, uma vez que na obtenção do cimento é usado um precursor não magnético, o MCPM. Zhang et al.<sup>106</sup> mostraram a obtenção de cimentos com comportamento superparamagnético e paramagnético com valores de magnetização entre 0,0053 e 0,018 emu·g<sup>-1</sup> a 20 000 Oe. Comparando o valor da magnetização do pó precursor TCP7Fe<sup>2+</sup>-1100 e do cimento HCPC7Fe, 0,50132 emu·g<sup>-1</sup> e 0,25512 emu·g<sup>-1</sup> para este mesmo campo magnético (20 000 Oe), respetivamente, verifica-se que os valores de magnetização são superiores aos apresentados por Zhang et al.<sup>106</sup>, embora o comportamento magnético seja diferente.

Comparando o CPC0Fe+NPs e o HCPC7Fe+NPs pode verificar-se que a incorporação de nanopartículas nos cimentos altera o comportamento magnético dos mesmos, proveniente das NPs de magnetite que apresentam um comportamento superparamagnético (Figura 50).

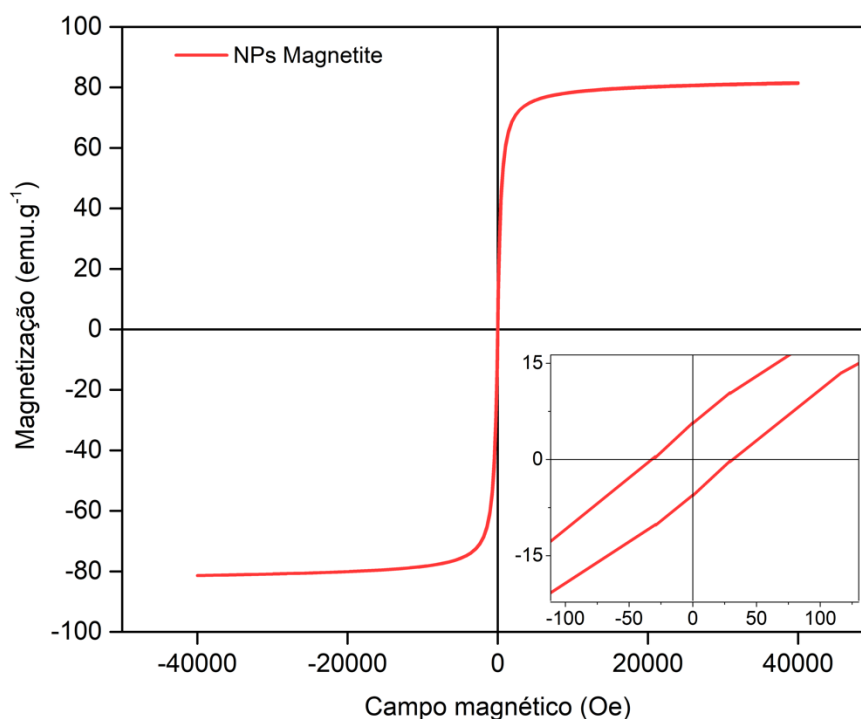
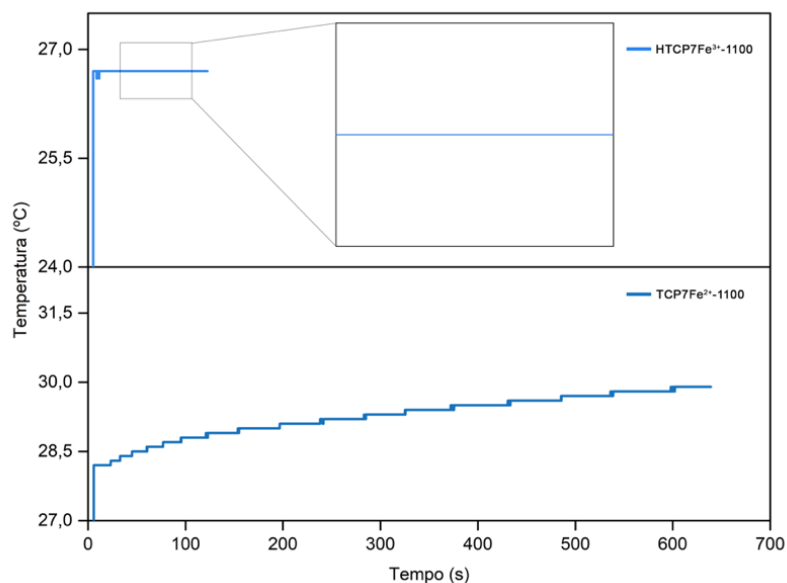


Figura 50 – Curva de magnetização em função do campo aplicado das nanopartículas de magnetite.

A presença de 1 wt.% de nanopartículas de magnetite no cimento obtido com os pós não dopados (CPC0Fe+NPs) e dopados (HCPC7Fe+NPs) resulta numa magnetização de saturação de 0,11058 emu·g<sup>-1</sup> e 0,54496 emu·g<sup>-1</sup>,

respetivamente. Para campos magnéticos superiores a  $\approx 5\ 000$  Oe, a curva do cimento HCPC7Fe+NPs apresenta uma linearidade, que poderá advir do comportamento antiferromagnético do cimento HCPC7Fe na ausência de NPs. De forma a perceber se o comportamento magnético do cimento obtido com pós dopados como precursores na presença de NPs (HCPC7Fe+NPs) resulta apenas da contribuição do comportamento superparamagnético das nanopartículas magnéticas, subtraiu-se a contribuição linear da amostra HCPC7Fe à amostra HCPC7Fe+NPs e que resultou em HCPC7Fe+NPs-subtraído. O resultado obtido mostra que a magnetização de saturação desta curva ( $0,29502\ \text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ ) é mais elevada que a do cimento obtido com pós puros e NPs ( $\text{CPC0Fe+NPs}$ ,  $0,11058\ \text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ ), cujo comportamento magnético resulta apenas da presença das NPs. Isto permite concluir que, além das duas contribuições presentes na amostra HCPC7Fe+NPs, superparamagnetismo e antiferromagnetismo, procedentes do cimento e das nanopartículas, podem existir outros fatores a influenciar a resposta magnética.

Não tendo sido possível avaliar a resposta hipertérmica destes cimentos em tempo útil apresentam-se na Figura 51, apenas os resultados da evolução da temperatura num intervalo de tempo 0-600s, para os pós precursores do cimento:  $\text{TCP7Fe}^{2+}\text{-1100}$  e  $\text{HTCP7Fe}^{3+}\text{-1100}$ .



**Figura 51 – Temperatura vs. Tempo: Curvas dos pós precursores do cimento HCPC7Fe:  $\text{TCP7Fe}^{2+}\text{-1100}$  e  $\text{HTCP7Fe}^{3+}\text{-1100}$ .**

Dos resultados obtidos, verifica-se que nenhum dos pós aquece quando exposto a um campo magnético alternado. No TCP7Fe<sup>2+</sup> calcinado a 1100°C observa-se um aumento ligeiro e gradual da temperatura com o decorrer do tempo, todavia o aumento é pouco significativo para aplicações em hipertermia. O pó HTCP7Fe<sup>3+</sup>-1100 não induz calor com o passar do tempo, não se verificando nenhum aumento de temperatura no tempo de ensaio efetuado.

Estes resultados mostram que estes pós por si só não apresentam resposta magnetotérmica, no entanto, o seu comportamento magnético pode ser adequado para a estimulação da proliferação e diferenciação celular osteoblástica. À semelhança do trabalho feito por Xu et al.<sup>107</sup>, é viável supor que a incorporação de nanopartículas nos cimentos obtidos com pós dopados com Ferro possibilite um aumento do calor produzido quando aplicado um campo magnético externo. Por outro lado, a interação das NPs com os pós dopados poderá resultar numa diminuição da quantidade de nanopartículas necessárias para obter as mesmas propriedades magnéticas e/ou magnetotérmicas.

### **3.4. Conclusões**

Do trabalho realizado neste capítulo pode concluir-se que:

- A presença do ião Ferro, mais propriamente da fase Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub> na composição dos fosfatos de cálcio, atrasa significativamente a reação de presa com o MCPM e conseqüentemente o tempo de presa das pastas cimentícias. Usando o pó precursor TCP7Fe-1100, que contém maioritariamente Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub>, os tempos de presa inicial e final foram demasiado longos (>> 2h 30 min) impedindo a obtenção de um cimento injetável para aplicação clínica.
- A mistura do pó TCP7Fe-1100 com outro contendo o mesmo teor de ferro, mas sem a fase Ca<sub>9</sub>Fe(PO<sub>4</sub>)<sub>7</sub> (composição HCPC7Fe) permitiu obter maior reatividade com o MCPM e conseqüentemente tempos de presa mais curtos (IST ~ 8 min e FST ~ 30 min).
- As pastas cimentícias CPC3Fe e HCPC7Fe mostraram ter boa capacidade de injetabilidade, tendo sido extrudidas com uma percentagem perto de 100%.

- Os valores obtidos para a resistência à compressão a húmido (2,3-3,54 MPa), embora não sejam muito elevados, estão dentro da gama de valores de RC para o osso trabecular.
- Ambas as composições CPC3Fe e HCPC7Fe apresentam bruchite como produto da reação, embora com quantidades significativas de precursores que não reagiram, mais evidente para a HCPC7Fe, que apresentou uma quantidade significativa de fase  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  precursora.
- O cimento HCPC7Fe apresenta um comportamento aparentemente antiferromagnético, em concordância com os pós precursores.
- A adição de nanopartículas magnéticas (1 wt.%) ao cimento HCPC7Fe deu origem a uma melhoria significativa da magnetização, comparativamente ao cimento na ausência de NPs.



## **Capítulo 4 – Considerações finais, limitações e trabalho futuro**





#### 4.1. Considerações gerais

Os resultados apresentados ao longo desta dissertação apresentam um avanço significativo na obtenção de cimentos ósseos injetáveis multifuncionais, embora seja necessária investigação adicional nesta área.

A obtenção de pós de fosfatos de cálcio dopados com íões Ferro foi conseguida com êxito, tendo-se obtido pós com propriedades magnéticas e biológicas muito promissoras. O aparecimento de uma nova fase cristalina na dopagem de  $\beta$ -TCP com íão ferro, não existente em dopagens de  $\beta$ -TCP com outros íões, confere a estes pós comportamentos diferentes em reações cimentícias, não reportados na literatura, que dificultaram os estudos na segunda fase do trabalho (Capítulo 3).

Sugerem-se como trabalhos futuros:

- Quantificar a o teor de Ferro total nos pós, bem como de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  por ICP e UV/Vis.
- Estudar outras condições de síntese e precursores de forma a obter pós com melhores propriedades magnetotérmicas.
- Estudar a solubilidade da fase cristalina  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  para tentar perceber qual o melhor sistema de reação química para a obtenção de um cimento, usando diferentes formulações de líquidos de presa e precursores.
- Estudo *in vitro* dos pós precursores e dos cimentos com aplicação de um campo magnético externo.
- Obter pós de fosfatos de cálcio co-dopados com Ferro e outros íões que possam melhorar as suas propriedades magnéticas, magnetotérmicas e biológicas.



## Referências

- (1) VanPutte, Cinnamon L.; Regan, Jennifer L.; Russo, A. F. *Seeley's Anatomy & Physiology*, 10th ed.; McGraw-Hill, 2014.
- (2) Tavares, V.; Canhão, H.; António, J.; Gomes, M.; Simões, E.; Romeu, J. C.; Coelho, P.; Santos, R. A.; Malcata, A.; Araújo, D.; et al. *Recomendações para o diagnóstico e terapêutica da osteoporose*.
- (3) 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  $\beta$ -tricalcium phosphate. *J. Inorg. Biochem.* 2014, 136, 57–66.
- (4) Boda, S. K.; Anupama, A. V.; Basu, B.; Sahoo, B. Structural and magnetic phase transformations of hydroxyapatite-magnetite composites under inert and ambient sintering atmospheres. *J. Phys. Chem. C* 2015, 119 (12), 6539–6555.
- (5) 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), 1–22.
- (6) Freitas, M. S.; Inforc, P. Fabrication of PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds by 3D mini-screw extrusion printing. 2016, 43031, 1–9.
- (7) Teyssédou, S.; Saget, M.; Pries, P. Kyphoplasty and vertebroplasty. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 2014, 100 (1), S169–S179.
- (8) Chow, L. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Natl. Institutes Heal.* 2009, 28 (1), 1–10.
- (9) Torres, P. M. C.; Gouveia, S.; Olhero, S.; Kaushal, A.; Ferreira, J. M. F. Injectability of calcium phosphate pastes: Effects of particle size and state of aggregation of  $\beta$ -tricalcium phosphate powders. *Acta Biomater.* 2015, 21, 204–216.
- (10) Bohner, M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Mater. Today* 2010, 13 (1–2), 24–30.
- (11) Arahira, T.; Maruta, M.; Matsuya, S. Characterization and in vitro evaluation of biphasic  $\alpha$ -tricalcium phosphate/ $\beta$ -tricalcium phosphate cement. *Mater. Sci. Eng. C* 2017, 74, 478–484.
- (12) Dorozhkin, S. V. Self-setting calcium orthophosphate formulations. *J. Funct. Biomater.* 2013, 4, 209–311.
- (13) Dorozhkin, S. V. *Calcium Orthophosphate Cements for Biomedical Application*. 2014, No. May 2008.
- (14) Torres, P. M. C. *Cimentos injetáveis à base de fosfatos de cálcio para vertebroplastia – Tese de Doutorado*, Universidade de Aveiro, 2016.
- (15) Perez, Roman A.; Patel, Kapil D.; Kim, H.-W. Novel magnetic nanocomposite injectables: calcium phosphate cements impregnated with ultrafine magnetic nanoparticles for bone regeneration. *R. Soc. Chem. Adv.* 1–27.
- (16) Kishore, R.; Srivastava, M.; Prasad, N. K.; Awasthi, S.; Dhayalan, A.; Kannan, S. Iron doped  $\beta$ -Tricalcium phosphate: Synthesis, characterization, hyperthermia effect, biocompatibility and mechanical evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* 2017, 78, 715–726.
- (17) Tampieri, A.; Alessandro, T. D.; Sandri, M.; Sprio, S.; Landi, E.; Bertinetti, L.; Panseri, S.;

Peponi, 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) Ramalho, A. C. A. Desenvolvimento e caracterização de cimentos ósseos inovadores Universidade da Beira Interior. 2010.

(19) Stewart, G. *The Skeletal and Muscular Systems*; 2004.

(20) Matos Canhão, H. C. Contribuição para a prevenção da osteoporose: Avaliação de factores genéticos, antropométricos, ambientais, laboratoriais e de dados densitométricos e de ultrasons em portugueses de ambos os sexos – Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, 2007.

(21) Bilezikian, John P.; Raisz, Lawrence G.; Rodan, G. A. *Principles of Bone Biology*, 2nd ed.; 2002.

(22) Keaveny, T. M.; Morgan, E. F.; Yeh, O. C.; Material, C.; Bone, C.; Bone, T. Source : Standard handbook of Biomedical Engineering and Design: Chapter 8 Bone Mechanics. 2004, 1–24.

(23) Barinov, S. M. Calcium phosphate-based ceramic and composite materials for medicine. *Russ. Chem. Rev.* 2010, 13–29.

(24) Canillas, M.; Pena, P.; Aza, A. H. De; Rodríguez, M. A. Calcium phosphates for biomedical applications. *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.* 2017, 56 (3), 91–112.

(25) *Anatomy and Physiology*; OpenStax CNX, 2017.

(26) Kini, Usha; Nandeesh, B. N. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*; Fogelman, Ignac; Gnanasegaran, Gopinath; van der Wall, H., Ed.; Springer, 2012; pp 29–57.

(27) Gilbert, S. F. *Developmental Biology*, 11th ed.; Sinauer Associates, 2016.

(28) Fauci, A. S.; Kasper, D. L.; Longo, D. L.; Braunwald, E.; Hauser, S. L.; Jameson, J. L.; Loscalzo, J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed.; 2008.

(29) Durfee, R. A.; Mohammed, M.; Luu, H. H. Review of Osteosarcoma and Current Management. *Rheumatol. Ther.* 2016, 3 (2), 221–243.

(30) Beckingsale, T. B.; Gerrand, C. H. Osteosarcoma. *Orthop. Trauma* 2010, 24 (5), 321–331.

(31) Metello, A. J. de O. M. Osteossarcoma , Quimioterapia HDMTX e Reflexos Laboratoriais António João de Oliveira Marques Metello Osteossarcoma, Quimioterapia HDMTX e Reflexos Laboratoriais, 2015.

(32) Grimer, R. J. Surgical options for children with osteosarcoma. *Lancet Oncol.* 2005, 6 (2), 85–92.

(33) Ando, K.; Heymann, M.-F.; Stresing, V.; Mori, K.; Rédini, F.; Heymann, D. Current Therapeutic Strategies and Novel Approaches in Osteosarcoma. *Cancers (Basel)*. 2013, 5 (2), 591–616.

(34) Arifi, S.; Belbaraka, R.; Rahhali, R.; Ismaili, N. Treatment of Adult Soft Tissue Sarcomas: An Overview. *Rare Cancers Ther.* 2015, 3 (1–2), 69–87.

(35) Marulanda, G. A; Henderson, E. R.; Johnson, D. A; Letson, G. D.; Cheong, D. Orthopedic surgery options for the treatment of primary osteosarcoma. *Cancer Control* 2008, 15 (1), 13–20.

(36) Nagarajan, R.; Neglia, J. P.; Clohisy, D. R.; Robison, L. L. Limb salvage and amputation in

survivors of pediatric lower-extremity bone tumors: What are the long-term implications? *J. Clin. Oncol.* 2002, 20 (22), 4493–4501.

(37) Bielack, B. S. S.; Kempf-bielack, B.; Exner, G. U.; Flege, S.; Helmke, K.; Kotz, R.; Salzer-kuntschik, M.; Werner, M.; Winkelmann, W.; Zoubek, A.; et al. Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *J. Clin Oncol* 2002, 20 (3), 776–790.

(38) Angele, M. K.; Albertsmeier, M.; Prix, N. J.; Hohenberger, P.; Abdel-Rahman, S.; Dieterle, N.; Schmidt, M.; Mansmann, U.; Bruns, C. J.; Issels, R. D.; et al. Effectiveness of regional hyperthermia with chemotherapy for high-risk retroperitoneal and abdominal soft-tissue sarcoma after complete surgical resection: A subgroup analysis of a randomized phase-III multicenter study. *Ann. Surg.* 2014, 260 (5), 749–756.

(39) Ratner, Buddy D.; Hofman, Allan S.; Schoen, Frederick J.; Lemons, J. E. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*; Academic Press, 1996.

(40) Luo, Y.; Engelmayer, G.; Auguste, D. T.; Ferreira, S.; Karp, J. M.; Saigal, R.; Langer, R. *3D Scaffolds*, Fourth Edi.; Elsevier, 2014.

(41) Barradas, A. M. C.; Yuan, H.; Blitterswijk, C. A. Van; Habibovic, P.; Medicine, T. *Osteoinductive Biomaterials: Current knowledge of properties.* 2011, 21, 407–429.

(42) Gomes, L. C.; Lello, B. C. Di; Campos, J. B.; Sampaio, M.; Janeiro, R. De; Janeiro, R. De. Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. 2012, 58, 448–452.

(43) Dorozhkin, S. V. Calcium Orthophosphates. *J. Mater. Sci.* 2007, No. February 2007.

(44) Bohner, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. 2000.

(45) Ginebra, M. P. 10. Calcium phosphate bone cements. In *Orthopaedic bone cements*; pp 206–230.

(46) Driessens, F. C. M.; Verbeeck, R. M. Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates. *Implant Mater. biofunction, Adv. Biomater.* Amsterdam Elsevier 1988, 105–111.

(47) Bohner, M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *Eur. Cells Mater.* 2010, 20, 1–12.

(48) de Almeida Pina, S. C. Cimentos de fosfatos de cálcio dopados para implantologia óssea – Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, 2009.

(49) Alves, H. L. R.; dos Santos, L. A.; Bergmann, C. P. Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008, 19 (5), 2241–2246.

(50) Tamimi, F.; Sheikh, Z.; Barralet, J. Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite. *Acta Biomater.* 2012, 8 (2), 474–487.

(51) Ishikawa, K. Bone substitute fabrication based on dissolution-precipitation reactions. 2010, 3, 1138–1155.

(52) LeGeros, R. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci.* 1991, 15, 1–201.

(53) Boanini, E.; Gazzano, M.; Bigi, A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at

low temperature. *Acta Biomater.* 2010, 6 (6), 1882–1894.

(54) Schumacher, M.; Gelinsky, M.; Schumacher, M. Strontium modified calcium phosphate cements – approaches towards targeted stimulation of bone turnover. *J. Mater. Chem. B* 2015, 3, 4626–4640.

(55) Gomes, S.; Kaur, A.; Grenèche, J.-M.; Nedelec, J.-M.; Renaudin, G. Atomic scale modeling of iron-doped biphasic calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomater.* 2016, 10.

(56) Morrissey, R.; Rodríguez-Lorenzo, L. M.; Gross, K. A. Influence of ferrous iron incorporation on the structure of hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2005, 16 (5), 387–392.

(57) 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/ $\beta$ -tricalcium phosphate mixtures. *Acta Biomater.* 2011, 7 (4), 1835–1843.

(58) Kannan, S.; Ventura, J. M.; Ferreira, J. M. F. Aqueous precipitation method for the formation of Mg-stabilized  $\beta$ -tricalcium phosphate: An X-ray diffraction study. *Ceram. Int.* 2007, 33 (4), 637–641.

(59) Kannan, S.; Pina, S.; Ferreira, J. M. F. Formation of strontium-stabilized  $\beta$ -tricalcium phosphate from calcium-deficient apatite. *J. Am. Ceram. Soc.* 2006, 89 (10), 3277–3280.

(60) Barinov, S. M.; Komlev, V. S. Calcium phosphate bone cements. 2011, 47 (13), 1470–1485.

(61) Han, B.; Ma, P.; Zhang, L.; Yin, Y.; Yao, K.  $\beta$ -TCP/MCPM-based premixed calcium phosphate cements. *Acta Biomater.* 2009, 5 (8), 3165–3177.

(62) Larsson, S. 17. Clinical aspects of calcium phosphate bone cements; Woodhead Publishing Limited.

(63) Theiss, F.; Apelt, D.; Brand, B.; Kutter, A.; Zlinszky, K.; Bohner, M.; Matter, S.; Frei, C.; Auer, J. A.; Rechenberg, B. Von. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. 2005, 26, 4383–4394.

(64) Bohner, M.; Gbureck, U.; Barralet, J. E. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment; *Biomaterials* 2005, 26, 6423–6429.

(65) Zhang, J.; Liu, W.; Schnitzler, V.; Tancret, F.; Bouler, J. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater.* 2014, 10 (3), 1035–1049.

(66) Driessens, F. C. M.; Planell, J. A.; Boltong, M. G.; Khairoun, I.; Ginebra, M. P. Osteotransductive bone cements. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 1998, 212 (6), 427–435.

(67) Leung, K. S.; Siu, W. S.; Li, S. F.; Qin, L.; Cheung, W. H.; Tam, K. F.; Po, P.; Lui, Y. An *in vitro* optimized injectable calcium phosphate cement for augmenting screw fixation in osteopenic goats. *J. Biomed. Mater. Res. Part. B Appl. Biomater.* 2005, 78B, 153–160.

(68) Bohner, M.; Baroud, G. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials* 2005, 26 (13), 1553–1563.

(69) Habib, M.; Baroud, G.; Gitzhofer, F.; Bohner, M. Mechanisms underlying the limited injectability of hydraulic calcium phosphate paste. Part II: Particle separation study. *Acta Biomater.* 2010, 6 (1), 250–256.

- (70) Heini, P. F.; Berlemann, U. Bone substitutes in vertebroplasty. Springer-Verlag 2001, 205–213.
- (71) Kobayashi, T. Chapter 15 - Cancer Hyperthermia Using Nanomagnetic Particles and Induction of Immune Responses. Handbook of Nanobiomedical Research. 465–499.
- (72) He, J.; Hu, H.; Zeng, X.; Lan, F.; Wu, F.; Wu, Y. A magnetic hydroxyapatite composite scaffold-based magnetic therapy for bone repair: an experimental study in canis lupus familiaris. Regen. Biomater. 2017, No. January, 97–103.
- (73) 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 reparation. Int. J. Nanomedicine 2012, 7, 3365–3378.
- (74) Cruz, Maria Margarida; Ferreira, Liliana P.; Alves, André F.; Mendo, Sofia G.; Ferreira, Paula; Godinho, Margarida; Carvalho, M. D. Chapter 19 - Nanoparticles for magnetic hyperthermia; Elsevier Inc., 2017.
- (75) Abenojar, Eric C.; Wickramasinghe, Sameera; Bas-Concepcion, Jesbaniris; Samia, A. C. S. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. Prog. Nat. Sci. Mater. Int. 2016, 26 (5), 440–448.
- (76) Zubarev, A. Y.; Iskakova, L. Y.; Abu-bakr, A. F. Magnetic hyperthermia in solid magnetic colloids. Physica A 2017, 467, 59–66.
- (77) Gil, S.; Mano, J. F. Magnetic composite biomaterials for tissue engineering. Biomater. Sci. 2014, 2 (6), 812–818.
- (78) 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.
- (79) Asín, L.; Ibarra, M. R.; Tres, A.; Goya, G. F. Controlled cell death by magnetic hyperthermia: Effects of exposure time, field amplitude and nanoparticle concentration. 2012, 1319–1327.
- (80) 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. 2012.
- (81) Aliramaji, S.; Zamanian, A.; Mozafari, M. Superparamagnetic responsive silk fibroin/chitosan/magnetite scaffolds with tunable pore structures for bone tissue engineering applications. Mater. Sci. Eng. C 2017, 70, 736–744.
- (82) Vlad, M. D.; del Valle, L. J.; Poata, I.; Barracó, M.; López, J.; Torres, R.; Fernández, E. Injectable iron-modified apatitic bone cement intended for kyphoplasty: cytocompatibility study. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2008, 19 (12), 3575–3583.
- (83) Vahabzadeh, Sahar; Bose, S. Effects of iron on physical and mechanical properties, and osteoblast cell interaction in  $\beta$ -tricalcium phosphate. Ann. Biomed. Eng. 2017, 45 (3), 819–828.
- (84) Rayner-Canham, Geoff; Overton, T. Descriptive Inorganic Chemistry, 5th ed.; 2015.
- (85) Cimdina-Berzina, L.; Borodajenko, N. Research of calcium phosphates using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology; Prof. Theophanides Theophile (Ed.), Ed.; InTech, 2012; Vol. 2, pp 123–148.
- (86) Bueno, C.; Villegas, M. L.; Bertolotti, S. G.; Previtali, C. M.; Neumann, M. G.; Encinas, M. V. The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions.

Photophysics and photochemical reaction. *Photochem. Photobiol.* 2002, 76 (4), 385–390.

(87) Batista, P. S. P. Diferenciação osteoblástica de células mesenquimatosas do tecido adiposo de rato na presença de purmorfamina, Universidade de Coimbra, 2009.

(88) Belik, A. A.; Izumi, F.; Stefanovich, S. Y.; Lazoryak, B. I.; Oikawa, K. Chemical and structural properties of a whitlockite-like phosphate,  $\text{Ca}_9\text{FeD}(\text{PO}_4)_7$ . 2002, No. 16, 3937–3945.

(89) Lazoryak, B. I.; Morozov, V. A.; Belik, A. A.; Khasanov, S. S. Crystal Structures and characterization of  $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$  and  $\text{Ca FeH}_{0,9}(\text{PO}_4)_7$ . 1996, 21 (122), 15–21.

(90) Destainville, A.; Champion, E.; Laborde, E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. 2003, 80, 269–277.

(91) Raynaud, S.; Champion, E.; Thomas, P. Calcium phosphate apatites with variable Ca / P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. 2002, 23 (3), 1065–1072.

(92) Jiang, Zhaoxia; Liu, Qingsong; Dekkers, M.J.; Colombo, Claudio; Yu, Yongjae; Barrón, Vidal; Torrent, J. Ferro and antiferromagnetism of ultrafine-grained hematite. 2014, 148–164.

(93) Cornell R. M.; Schwertmann U. The iron oxides - Structure, properties, reactions, occurrences and uses; Wiley-VCH GmbH & Co, 1972; Vol. 236, pp 285–286.

(94) 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 (5), 3520–3528.

(95) Vlad, M. D.; Valle, L. J.; Poeată, I.; López, J.; Torres, R.; Barracó, M.; Fernández, E. Biphasic calcium sulfate dihydrate/iron-modified  $\alpha$ -tricalcium phosphate bone cement for spinal applications: in vitro study. *Biomed. Mater.* 2010, 5 (2), 025006.

(96) Vlad, M. D.; Şindilar, E. V.; Mariñoso, M. L.; Poeată, I.; Torres, R.; López, J.; Barracó, M.; Fernández, E. Osteogenic biphasic calcium sulphate dihydrate/iron-modified  $\alpha$ -tricalcium phosphate bone cement for spinal applications: In vivo study. *Acta Biomater.* 2010, 6 (2), 607–616.

(97) Hou, C. Han; Chen, C. Wei; Hou, S. Mou; Li, Y. Ting; Lin, F. Huei. The fabrication and characterization of dicalcium phosphate dihydrate-modified magnetic nanoparticles and their performance in hyperthermia processes in vitro. *Biomaterials* 2009, 30 (27), 4700–4707.

(98) Dorozhkin, S. Calcium orthophosphates: Applications in nature, Biology and medicine; Taylor & Francis, 2012.

(99) Kirwan, L. J.; Deeney, F. A.; Croke, G. M.; Hodnett, K. Characterisation of various Jamaican bauxite ores by quantitative Rietveld X-ray powder diffraction and  $^{57}\text{Fe}$  Mössbauer spectroscopy. *Int. J. Miner. Process.* 2009, 91 (1–2), 14–18.

(100) Torres, P. M. C. Reciclagem de Lamas de Granito Ornamental em Pastas Cerâmicas, Universidade de Aveiro, Universidade de Aveiro, 2007.

(101) Myers, D. Surfaces, interfaces, and colloids: Principles and applications; 1999; Vol. 358.

(102) Young, Hugh D.; Freedman, R. A. Sears and Zemansky's University Physics with Modern Physics, 13th ed.; Addison-Wesley, 2012.

(103) Good, R. J. The contact angle in mercury intrusion porosimetry. *powder technology.* 1981, 29, 53–62.

(104) Bó, M. D.; Neves, W. F. das; Amaral, S. do. Substituição do mercúrio por água na determinação da densidade aparente do suporte cerâmico cru. *Cerâmica Ind.* 2002, 7 (2), 42–46.



- (105) Burguera, Elena F.; Xu, Hockin H. K.; Sun, L. Injectable calcium phosphate cement: Effects of powder-to-liquid ratio and needle size. *J. Biomed. Mater. Res.* 2008, 84 (2), 493–502.
- (106) Zhang, J.; Shi, H. S.; Liu, J. Q.; Yu, T.; Shen, Z. H.; Ye, J. D. Good hydration and cell-biological performances of superparamagnetic calcium phosphate cement with concentration-dependent osteogenesis and angiogenesis induced by ferric iron. *J. Mater. Chem. B* 2015, 3 (45), 8782–8795.
- (107) Xu, C.; Zheng, Y.; Gao, W.; Xu, J.; Zuo, G.; Chen, Y.; Zhao, M.; Li, J.; Song, J.; Zhang, N.; et al. Magnetic hyperthermia ablation of tumors using injectable Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/calcium phosphate cement. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7 (25), 13866–13875.



## **Anexos**



## Anexo 1

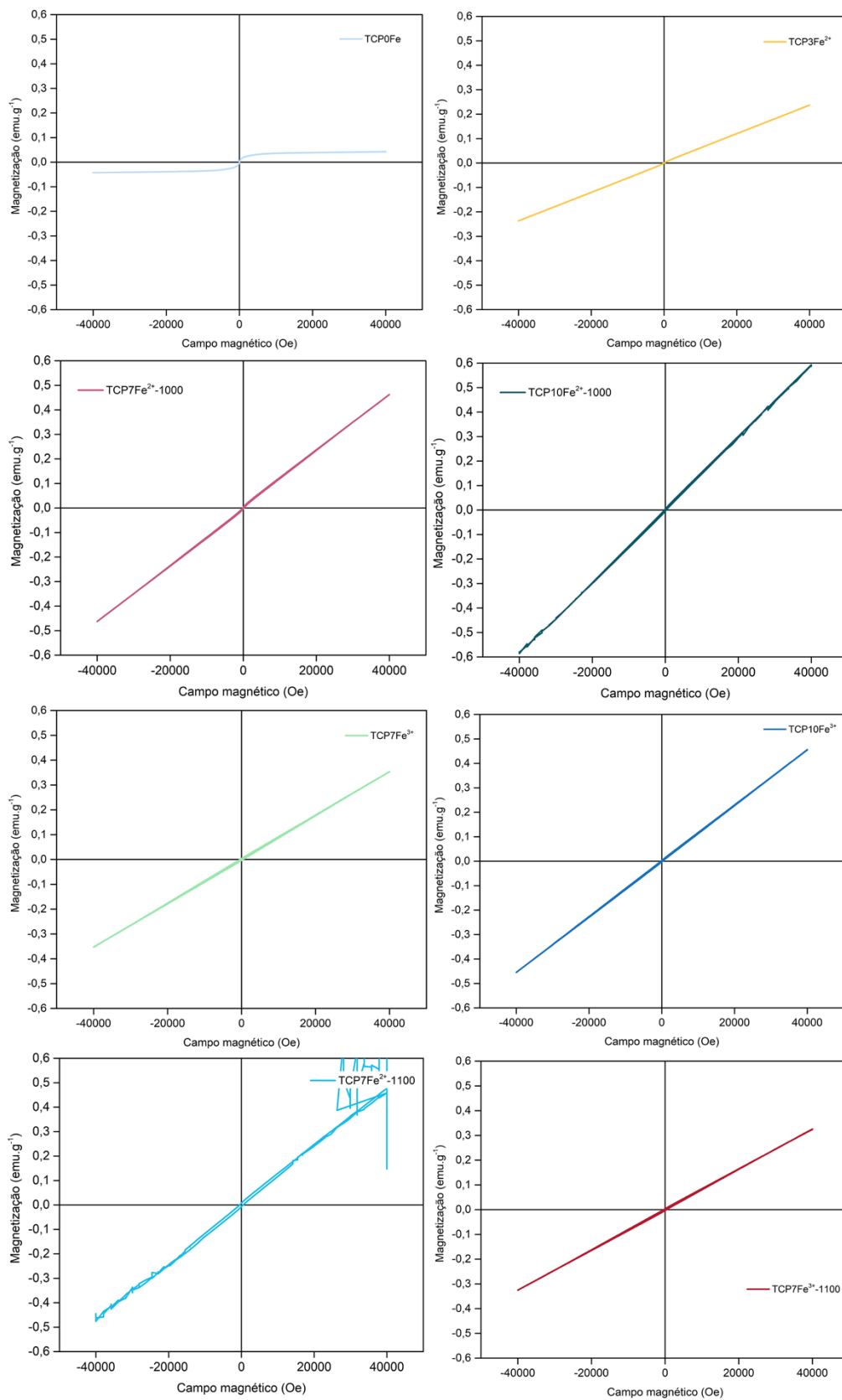


Figura 52 – Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado dos vários pós TCP-Fe.