



**Ana Catarina Fontes
Da Silva**

**Estruturas tridimensionais de base natural com
propriedades mecânicas / biológicas sinérgicas
para engenharia de tecidos ósseos**



**Ana Catarina Fontes
Da Silva**

**Estruturas tridimensionais de base natural com
propriedades mecânicas / biológicas sinérgicas
para engenharia de tecidos ósseos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica do Doutor Gil Gonçalves, Investigador Auxiliar do Centro de Tecnologia Mecânica e Automação (TEMA) da Universidade de Aveiro e coorientação científica da Doutora Paula Marques, Investigadora Principal do Centro de Tecnologia Mecânica e Automação (TEMA) da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida
Professora Auxiliar Aposentada, Universidade de Aveiro

Doutora Carla Andreia Cunha Vilela
Equiparada a Investigadora Auxiliar, Universidade de Aveiro

Doutor Gil Alberto Batista Gonçalves
Equiparado a Investigador Auxiliar, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Quero agradecer ao meu orientador, Dr. Gil Gonçalves, pela sua disponibilidade e por puxar por mim fazendo-me querer sempre saber mais. À minha coorientadora, Dra. Paula Marques, pela sua simpatia e pelo apoio durante a realização deste trabalho. Bem como, aos meus colegas de laboratório por me terem recebido de braços abertos, pela boa disposição, pela ajuda que me deram e por todas as palavras de força. Um agradecimento muito especial aos meus pais e à minha irmã que sem o apoio incondicional deles isto não era possível. Aos meus amigos de longa data, por me darem ânimo e por me acompanharem, de longe ou de perto, mas sempre com muito carinho. Às minhas amigas, Adriana e Daniela, que estiveram sempre comigo durante esta fase e que contribuíram para que estes últimos anos fossem os melhores. A todas as pessoas, que estão presentes na minha vida e no meu coração, que de alguma forma contribuíram para concluir esta grande etapa da minha vida que foi o meu Mestrado.

palavras-chave

Engenharia de tecidos; Esponjas marinhas; Fosfatos de cálcio;

resumo

A engenharia de tecidos tem adotado diferentes estratégias na concepção de novos biomateriais, tendo como objetivo a procura de soluções que permitam mimetizar cada vez melhor as condições *in-vivo*, de modo a obter uma regeneração de tecidos funcionais acelerada. Uma das mais recentes estratégias consiste no desenvolvimento de estruturas porosas tridimensionais (3D), que servem como suportes temporários para a deposição de células, permitindo a sua adesão, proliferação e produção de matriz extracelular (MEC), que conduzirá à formação acelerada de novo tecido. Neste trabalho foram desenvolvidos biomateriais nanocompósitos a partir da estrutura 3D de esponjina obtida a partir de um material natural, a esponja do mar (EM), com vista a uma potencial aplicação na área de regeneração óssea. O desenvolvimento destes materiais baseia-se no crescimento controlado de filmes finos de fosfatos de cálcio na matriz da EM através da imersão em diferentes soluções de fluido corporal simulado (SBF e 10xSBF). Para tal, foram utilizadas 2 abordagens: a primeira abordagem consistiu no crescimento de fosfatos de cálcio diretamente na superfície da matriz da EM; a segunda abordagem consistiu na modificação superficial prévia da matriz da EM através de diversos agentes promotores de nucleação (molecular, polieletrólitos e polímeros naturais) e posterior crescimento dos fosfatos de cálcio. Os materiais resultantes foram caracterizados em termos da sua estabilidade estrutural (testes de compressão estáticos e dinâmicos), morfologia (SEM e micro-CT) e composição química (EDS e FTIR). Os resultados obtidos mostraram que as amostras de EM modificadas com polímeros naturais imersas em solução de 10XSBF em agitação contínua e à temperatura ambiente, apresentaram maior uniformidade e persistência do recobrimento de fosfatos de cálcio na sua superfície. Estudos de biocompatibilidade com osteoblastos mostraram elevada percentagem de viabilidade celular nas amostras com polímeros naturais e fosfatos de cálcio e uma elevada capacidade para promover a mineralização.

Keywords

Tissue engineering; Marine sponges; Calcium phosphates;

Abstract

Tissue engineering has adopted different strategies in the design of new biomaterials, with the objective of finding solutions that allow to mimic each view better *in vivo* conditions, in order to obtain an accelerated functional tissue regeneration.

One of the most recent strategies is the development of three-dimensional (3D) porous structures, which serve as temporary supports for the deposition of cells, allowing their adhesion, proliferation and production of extracellular matrix, that will lead to the accelerated formation of the new tissue. In this work, nanocomposite biomaterials were developed from natural materials, the 3D spongin structure obtained through the marine sponge, for a future application in the field of bone regeneration. The development of these materials is based on the controlled growth of a thin layer of calcium phosphates in the marine sponge matrix through immersion in different solutions of simulated body fluid (SBF and 10xSBF). For that, 2 approaches were used: the first approach consisted of the growth of calcium phosphates directly on the surface of the marine sponge matrix; the second approach consisted of the superficial modification of the marine sponge matrix through several nucleation promoting agents (molecular, polyelectrolytes and natural polymers) and subsequent growth of calcium phosphates. The resulting materials were characterized in terms of their structural stability (static and dynamic compression tests), morphology (SEM and micro-CT) and chemical composition (EDS and FTIR).

The results obtained with the marine sponge samples modified with natural polymers immersed in a 10XSBF solution under continuous stirring and at room temperature, showed greater uniformity and persistence of the calcium phosphate coating on its surface. Biocompatibility studies with osteoblasts have shown a high percentage of cell viability in samples with natural polymers and calcium phosphates and also a high capacity to promote mineralization.

Índice

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS	XIV
NOMENCLATURA	XV
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ENQUADRAMENTO.....	1
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.2.1 Engenharia de tecidos aplicadas ao tecido ósseo	2
1.2.2 Tecido ósseo	4
1.2.2.1 Organização do tecido ósseo	4
1.2.2.2 Componentes celulares do tecido ósseo	7
1.2.2.3 Remodelação óssea	8
1.2.2.4 Propriedades mecânicas do tecido ósseo	9
1.2.3. Biomateriais para a regeneração óssea	10
1.2.3.1 Esponjas Marinhas	13
1.2.3.2 Fosfatos de Cálcio	17
1.2.4. Bionanocompósitos para regeneração óssea.....	21
1.2.4.1 Bioestimulação físico/química.....	23
1.3. OBJETIVOS	26
1.4. ESTRUTURA.....	26
CAPÍTULO II.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1. MATERIAIS.....	27
2.2. REAGENTES.....	27
2.3. MÉTODOS.....	28
3.3.1 Purificação da matriz da EM.....	28

2.3.2 Tratamento térmico das EM	29
2.3.3 Método de modificação superficial das EM	29
2.3.3.1 Modificação por polieletrólitos	29
2.3.3.2 Modificação com biopolímeros	30
2.3.3.3 Modificação com corantes	30
2.3.4 Preparação da solução SBF e 10xSBF	30
2.3.5 Condições de imersão e análise.....	32
2.4. ENSAIOS CELULARES	32
2.4.1 Viabilidade Celular.....	32
2.4.2 Morfologia celular	33
2.4.3 Mineralização	33
2.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	34
2.5.1 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	34
2.5.2 Espectroscópio de raios X por dispersão em energia (EDS).....	34
2.5.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	34
2.5.4 Difração de Raios-X (DRX).....	35
2.5.5 Termogravimetria (TGA).....	35
2.5.6 Microtomografia de raios X (Micro-CT).....	36
2.6. ENSAIOS MECÂNICOS	36
CAPÍTULO III.....	38
3. CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA MATRIZ DA EM	38
3.1. PURIFICAÇÃO DA MATRIZ DA EM.....	38
3.2. TRATAMENTO TÉRMICO.....	44
3.3. CONCLUSÃO	49
CAPÍTULO IV	50
4. CRESCIMENTO CONTROLADO DE FOSFATOS DE CÁLCIO NA MATRIZ DA EM ATRAVÉS DE INCUBAÇÃO EM SBF E 10XSBF	50
4.1. CRESCIMENTO DE FOSFATOS DE CÁLCIO POR INCUBAÇÃO EM ESTUFA.....	51
4.1.1. Incubação em SBF	51
4.1.2 Incubação em 10xSBF	53

4.2. CRESCIMENTO DE FOSFATOS DE CÁLCIO COM AGITAÇÃO MECÂNICA	55
4.2.1 Incubação em 10xSBF	56
4.3. CRESCIMENTO DE FOSFATOS DE CÁLCIO COM AGITAÇÃO MECÂNICA E TEMPERATURA CONTROLADA	61
4.3.1 Incubação em 10xSBF	61
4.4. CONCLUSÃO	63
CAPÍTULO V	65
<hr/>	
5. CRESCIMENTO DE FOSFATOS DE CÁLCIO COM MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DA MATRIZ DA EM	65
5.1. EM MODIFICADAS COM POLIELETRÓLITOS	65
5.2. EM MODIFICADA COM BIOPOLÍMEROS.....	67
5.3. EM MODIFICADA COM CORANTES.....	76
5.4. CONCLUSÃO	82
CAPÍTULO VI	84
6. ENSAIOS CELULARES	84
6.1. ESTUDOS DE BIOCMPATIBILIDADE	84
6.2. MINERALIZAÇÃO CELULAR.....	88
6.2. CONCLUSÃO	91
CAPÍTULO VII	92
7. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	92
BIBLIOGRAFIA.....	94

Lista de Figuras

Figura 1 Esquema dos diversos componentes envolvidos em engenharia de tecidos.	4
Figura 2 Estrutura biológica do osso [83].	5
Figura 3 Hierarquia estrutural do osso [11].	6
Figura 4 Representação esquemática da distribuição das diferentes células ósseas [15].	7
Figura 5 Figura representativa do processo biológico de remodelação óssea [17]. ..	9
Figura 6 Esquema de biomateriais poliméricos e respetiva fonte natural [21].	12
Figura 7 Exemplos de EM das diferentes classes do filo porífera. (a) <i>Aplysina cavernicola</i> , (b) <i>Ephydatia fluviatilis</i> , (c) <i>Xestospongia muta</i> , (d) <i>Sycon ciliatum</i> , (e) <i>Clathrina contorta</i> , (f) <i>Leucosolenia complicata</i> , (g) <i>Rosella nuda</i> , (h) <i>Oopsacas minuta</i> e (i) <i>Oscar</i>	15
Figura 8 Imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM). (a, b) fibras de esponja antes do tratamento hidrotérmico em butóxido de titânio (IV) (TBOT); (c, d) TiO_2 imobilizado na esponja ($Spl-TiO_2$) obtida por síntese hidrotérmica; (e) medições de espectros.	23
Figura 9 Diagrama esquemático da estimulação mecânica celular [65].	24
Figura 10 Amostras de <i>Hippospongia communis</i> comercial e cortadas com as dimensões de 5 mm^3	27
Figura 11 Processo de lavagem das amostras de EM.	28
Figura 12 Realização da caracterização das amostras de EM através do FTIR.	35
Figura 13 Equipamento Shimadzu MMT-101N com a amostra de EM em posição para realizar o teste mecânico.	37
Figura 14 Imagens de SEM a diferentes ampliações da amostra de EM sem lavagem a) e b), EM_H ₂ O c) e d) e da EM_HCl e) e f).	38
Figura 15 Micrografias de mapeamento do EDS com ampliação x2k da amostra EM_H ₂ O.	40
Figura 16 Micrografias de mapeamento do EDS com ampliação x2k da amostra EM_HCl.	40
Figura 17 Gráfico de TGA das amostras EM, EM_H ₂ O e EM_HCl.	41
Figura 18 Gráfico de FTIR das amostras de EM, EM_H ₂ O e EM_HCl.	42

Figura 19 Gráfico do módulo de Young das amostras de EM.	43
Figura 20 Gráfico da tensão-deformação das várias amostras de EM.	43
Figura 21 Gráfico do diâmetro das fibrilas das amostras EM_HCl e EM_TT.	45
Figura 22 Imagens obtidas por micro-CT das amostras a) EM_HCl; b) EM_TT.	46
Figura 23 Imagens SEM das amostras: a) e b) EM_HCl; c) e d) EM_TT.	46
Figura 24 Gráfico do FTIR das amostras de EM_HCl e EM_TT.	47
Figura 25 Gráfico do módulo de Young das amostras de EM_HCl e EM_TT.	48
Figura 26 Gráfico da tensão-deformação da EM_HCl e da EM_TT.	49
Figura 27 Imagens SEM das amostras de EM incubadas em SBF durante: a) e b) 7 dias; c) e d) 14 dias e e) e f) 30 dias.	51
Figura 28 Imagens SEM das amostras tratadas termicamente incubadas em SBF durante 30 dias: a) ampliação 400; b) ampliação 2k.	53
Figura 29 Imagens SEM das amostras EM_HCl imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.	53
Figura 30 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras incubadas em 10xSBF e os valores de pH da solução após cada incubação.	54
Figura 31 Gráfico do FTIR das amostras incubadas em 10xSBF durante 24 horas (EM_24), 48 horas (EM_48) e 5 dias (EM_120).	55
Figura 32 Imagens SEM das EM_HCl imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.	56
Figura 33 Imagens obtidas por micro-CT das amostras: a) EM_HCl e b) em agitação durante 24 horas em 10xSBF.	57
Figura 34 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras e os valores de Ph da solução após cada incubação.	58
Figura 35 Gráfico do FTIR das amostras incubadas em 10xSBF durante 24 horas (EM_24), 48 horas (EM_48) e 5 dias (EM_120).	58
Figura 36 Gráfico do DRX das amostras incubadas e agitadas em 10xSBF durante 24 horas.	59
Figura 37 Gráfico do teste dinâmico da amostra incubada e agitada em 10xSBF durante 24 horas.	60
Figura 38 Imagens de SEM com ampliação de 400 da amostra imersa em 10xsbf durante 24 horas: a) antes do teste dinâmico; b) depois do teste dinâmico.	60

Figura 39 Imagens SEM das amostras EM_HCL imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.....	61
Figura 40 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras e os valores de pH da solução após cada incubação.	62
Figura 41 Gráfico do FTIR das amostras incubadas em 10xSBF durante 24 horas (EM_24) e 48 horas (EM_48).	63
Figura 42 Imagens SEM das amostras revestidas por PEI+PSS imersas em 10xSBF durante: a) 24 horas; b) 48 horas e c) 5 dias.....	66
Figura 43 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras e dos valores de pH da solução após cada incubação.....	67
Figura 44 Imagens SEM das amostras revestidas de: a) alginato; b) quitosano.	68
Figura 45 Imagens SEM das amostras modificada com alginato imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.	69
Figura 46 Mapeamento da amostra modificada com alginato obtida por EDS.	70
Figura 47 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras modificada com alginato e dos valores de pH da solução após cada incubação.	70
Figura 48 Gráfico do FTIR das amostras modificada com alginato imersas em 10xSBF durante 24 horas (ALG_24), 48 horas (ALG_48) e 120 horas (ALG_120).	71
Figura 49 Gráfico do DRX de uma amostra modificada com alginato e com fosfatos de cálcio.	72
Figura 50 Imagens SEM das amostras modificada com quitosano imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.	73
Figura 51 Mapeamento da amostra modificada com quitosano, imersas durante 24 horas em 10xSBF, obtidas por EDS.....	74
Figura 52 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras e dos valores de pH da solução após cada incubação.....	74
Figura 53 Gráfico do FTIR das amostras modificada com quitosano imersas em 10xSBF durante 24 horas (Qt_24), 48 horas (Qt_48) e 120 horas (Qt_120).....	75
Figura 54 Grupos Funcionais dos corantes: a) RB e b) MB.....	76
Figura 55 SEM com ampliação x200 das amostras com corante RB incubadas em 10Xsbf no período de a)24 horas; b)48 horas e c)15 dias.....	77

Figura 56 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras com RB e dos valores de pH da solução após cada incubação.....	78
Figura 57 Imagens obtidas por micro-CT das amostras com RB: a) antes da imersão em 10xSBF e b) após 24 horas em 10xSBF.	78
Figura 58 Gráfico do FTIR das amostras revestidas do corante RB imersas em 10xSBF durante 24 horas (RB_24), 48 horas (RB _48) e 120 horas (RB _120).	79
Figura 59 Gráfico do DRX de uma amostra modificadas com RB e com fosfatos de cálcio.	80
Figura 60 SEM com ampliação x200 das amostras com corante MB incubadas em 10xSBF no período de a) 24 horas; b) 48 horas e c) 120 horas.....	80
Figura 61 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras com MB e dos valores de pH da solução após cada incubação.	81
Figura 62 Gráfico do FTIR das amostras modificadas com corante MB imersas em 10xSBF durante 24 horas (MB_24), 48 horas (MB _48) e 120 horas (MB _120).	82
Figura 63 a) Gráfico da percentagem de células viáveis nas amostras EM e EM com fosfatos de cálcio (EM+CaP); b) SEM da EM ao 7º dia de cultura; c) SEM da EM com fosfatos de cálcio ao 7º dia de cultura.	84
Figura 64 a) Gráfico da percentagem de células viáveis nas amostras EM, EM com alginato e EM com alginato e fosfatos de cálcio; b) SEM da EM com alginato ao 7º dia de cultura; c) SEM da EM com alginato e fosfatos de cálcio com fosfatos de cálcio ao 7º dia.	85
Figura 65 a) Gráfico da percentagem de células viáveis nas amostras EM, EM com quitosano e EM com quitosano e fosfatos de cálcio; b) SEM da EM com quitosano ao 7º dia de cultura; c) SEM da EM com quitosano e fosfatos de cálcio com fosfatos de cálcio ao 7º dia.	86
Figura 66 Gráfico da percentagem de células viáveis nas amostras com fosfatos de cálcio na EM, EM modificada com alginato (EM+ALG+CaP) e EM modificada com quitosano (EM+QUI+CaP).....	88
Figura 67 Gráfico com valores de densidade ótica das amostras de EM com e sem fosfatos de cálcio ao fim de 7 dias de cultura.	89

Figura 68 Gráfico com valores de densidade ótica das amostras de EM revestidas com os polímeros naturais, alginato e quitosano, com e sem fosfatos de cálcio ao fim de 7 dias de cultura. 90

Lista de Tabelas

Tabela 1 Propriedades mecânicas do osso cortical e esponjoso.....	9
Tabela 2 Propriedades e aplicações de biomateriais [18][19].....	11
Tabela 3 Fases de fosfatos de cálcio.....	19
Tabela 4 Ordem, reagentes e as respectivas quantidades para a preparação de 2 litros de SBF [62] e 10xSBF [63].....	31
Tabela 5 Massa normalizada dos elementos das amostras de EM, sem lavagem e lavadas com água destilada e HCL.....	39
Tabela 6 Concentrações iônicas do plasma humano e do SBF [62].....	50
Tabela 7 Massa normalizada dos elementos presentes das amostras incubadas em SBF durante 7, 14 e 30 dias.....	52

Nomenclatura

DRX	Difração de raios-X
EM	Esponja do mar
EDS	Espectroscópio de raios-X por dispersão em energia (do inglês “ <i>Energy dispersive X-ray spectroscopy</i> ”)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês “ <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> ”)
HCl	Ácido clorídrico
MB	Azul de metileno
MEC	Matriz extracelular
Micro-CT	Microtomografia de raios-X
PEEK	Poli(éter-éter-cetona)
PEI	Poli(etilenimina)
PMMA	Polimetilmetacrilato
PSS	Poliestireno sulfonado
RB	Rodamina B
SBF	Fluido corporal simulado
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês “ <i>scanning electron microscope</i> ”)
TGA	Termogravimetria (do inglês “ <i>Thermogravimetric analysis</i> ”)
3D	Tridimensional

CAPÍTULO I

1. Introdução

1.1. Enquadramento

A engenharia de tecidos ósseos é uma área que atualmente está a ser bastante dinamizada, tanto em termos de utilização de novas técnicas, como também no desenvolvimento de novos biomateriais. Esta área tem como objetivo primordial a reconstrução de defeitos ósseos recorrendo para isso ao uso de enxertos ósseos que posteriormente são implantados no paciente, com a finalidade de regenerar as estruturas ósseas danificadas [1].

Os enxertos ósseos podem ser autólogos, sendo que estes têm origem no próprio paciente, apresentam bons resultados e são considerados o método mais eficaz, uma vez que possuem um menor risco de rejeição. No entanto, apresentam uma disponibilidade limitada e podem originar o enfraquecimento das estruturas ósseas dadoras. Um outro tipo de enxertos são os aloenxertos e têm origem num dador da mesma espécie que o paciente [2][3]. Este tipo de enxertos pode provocar alteração das propriedades mecânicas, necessita de utilização de imunossuppressores, requiere técnicas de esterilização e armazenamento bastante complexas, tem custos elevados e apresenta também uma disponibilidade limitada. Além desses tipos de enxertos, existem ainda os xenoenxertos, que têm origem num dador não humano, e que por isso mesmo apresentam um maior risco de rejeição e transmissão de doenças [1][2][4].

De modo a ultrapassar estes desafios, a engenharia de tecidos apresenta uma panóplia de soluções, que envolve um conjunto de métodos que visam substituir ou reparar tecidos com biomateriais naturais, sintéticos ou semissintéticos que tentam mimetizar os tecidos naturais. Estes biomateriais devem, na maioria dos casos, apresentar tridimensionalidade (3D). Além disso, é fundamental que estas estruturas 3D possuam requisitos biológicos adequados similares ao osso natural, tais como o tamanho, forma, espessura, porosidade, morfologia da superfície, taxa de degradação e estabilidade mecânica [1]. Outro requisito importante é que os novos materiais tenham a capacidade de induzir a função celular desejada, ou seja, estimular

respostas celulares específicas e ativar genes que promovem a diferenciação celular e a produção de MEC de forma a aumentar a capacidade para a regeneração dos tecidos danificados.

Estruturalmente o tecido ósseo assemelha-se a um material nanocompósito, em que cristais nanométricos de hidroxiapatite (HAP) se encontram dispersos numa matriz de colagénio de uma forma muito padronizada. Nesse sentido, os materiais nanocompósitos surgem como uma opção promissora na regeneração de tecidos. Estes possuem capacidade de promover a adesão e proliferação celular e, conseqüentemente, o crescimento de novo osso [5]. Para além disso, o seu desempenho mecânico aprimorado permite a transdução adequada dos estímulos mecânicos para o nível celular.

1.2. Revisão Bibliográfica

1.2.1 Engenharia de tecidos aplicadas ao tecido ósseo

O conceito “engenharia de tecidos” representa um campo multidisciplinar, que combina várias áreas como biologia celular e molecular, química, ciência dos materiais, engenharia e medicina [4]. Esta forma de engenharia foca-se no desenvolvimento de substitutos biológicos que mantêm, melhoram ou restauram funções dos tecidos nativos [4] [6]. A engenharia de tecidos é utilizada com sucesso em diversas áreas, nomeadamente na ortopedia, onde é frequentemente realizada a reparação ou substituição de tecido ósseo, cartilagens e ligamentos [7], e explora as propriedades fisiológicas do tecido ósseo para induzir a formação de novos tecidos funcionais.

Atualmente varias abordagens têm sido exploradas na conceção de substitutos de tecidos danificados, incluindo a incorporação de dispositivos mecânicos, transplantes de órgãos ou reconstrução cirúrgica [4]. Apesar destas técnicas serem muito vantajosas para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes ou até mesmo salvar vidas humanas, apresentam algumas limitações significativas. No caso dos dispositivos mecânicos, estes ainda não cumprem todas as funções desempenhadas pelos tecidos naturais e apresentam baixa eficiência relativamente ao controlo da deterioração progressiva da condição do paciente [8]. A nível do transplante de órgãos, a falta de doadores e a possibilidade de rejeição de tecidos são fatores

condicionantes. Além disso, estes apresentam efeitos adicionais, como dor e suscetibilidade à infecção. Relativamente à reconstrução cirúrgica, podem ser utilizados enxertos ósseos (autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos) sendo que o autoenxerto é o método clinicamente mais utilizado. A grande vantagem desta prática clínica incide na baixa taxa de rejeição do implante e conseqüentemente, baixas complicações daí resultantes. No entanto, esta metodologia é limitada quando a lesão é de grandes dimensões [6].

Neste contexto, estruturas 3D denominadas em inglês por “*scaffolds*”, têm sido estudadas com o intuito de serem utilizadas como soluções terapêuticas na regeneração óssea. Estas estruturas sintéticas podem ser produzidas através de diferentes tipos de materiais, como polímeros, cerâmicos, metais ou compósitos [9]. Além disso, a aplicação de tais materiais em engenharia de tecidos ósseos deve atender a requisitos físicos e biológicos adequados similares ao osso natural, tais como o tamanho, forma, espessura, porosidade, morfologia da superfície, taxa de degradação e estabilidade mecânica [2]. A réplica das características fisiológicas do osso através das estruturas 3D sintéticas permite contribuir para estimular os processos biológicos de reparação óssea e conseqüentemente induzir a formação acelerada de tecido ósseo [6]. É também relevante que não induzam efeitos citotóxicos e tenham baixa imunogenicidade, e para além disso, mediante a aplicação, pode ser relevante apresentarem biodegradabilidade.

De facto, as estruturas 3D apresentam-se atualmente como uma das abordagens mais promissoras para a regeneração óssea. Para além disso, a validação das estruturas 3D permite combinar terapias baseadas em células (manipulando a bioquímica celular) e fatores de crescimento para o desenvolvimento acelerado de novos tecidos (figura 1) [10][11].



Figura 1 Esquema dos diversos componentes envolvidos em engenharia de tecidos.

1.2.2 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo rígido, dinâmico, altamente vascularizado, com a capacidade contínua de regeneração e remodelação. Este apresenta como principais funções a sustentação do corpo, permitir a execução de movimentos, proteção dos órgãos vitais, armazenamento de minerais e gordura, e desempenha um papel preponderante na produção de células sanguíneas.

O tecido ósseo é formado por um material extracelular, denominado de matriz óssea. A matriz extracelular é constituída aproximadamente por cerca de 35% de material orgânico e 65% do material inorgânico. O material orgânico, é constituído essencialmente por colagénio, e é responsável pela flexibilidade e resiliência do osso. A fração inorgânica é constituída principalmente por cristais de fosfatos de cálcio denominados HAP, e é responsável pela dureza e rigidez do osso [12].

1.2.2.1 Organização do tecido ósseo

O tecido ósseo maduro pode ser classificado, com base na sua organização macroestrutural, como cortical (compacto) e esponjoso (trabecular) [13]. O osso cortical é denso, sólido e homogéneo, apresenta cerca de 10% de porosidade. Em relação ao osso esponjoso, este apresenta cerca de 50 a 90% porosidade e é composto por uma rede de trabéculas irregulares de tecido ósseo, semelhantes a

favos de mel [11]. As percentagens de osso cortical e esponjoso diferem ao longo do esqueleto.

Dos duzentos e seis ossos que constituem o corpo humano adulto, existem vários tipos que podem ser agrupados quanto à sua forma, ossos longos, ossos curtos, ossos chatos, ossos irregulares e finalmente ossos sesamoides. No caso dos ossos longos, estes podem ser divididos em epífise, metáfise e diáfise (figura 2). As epífises são as extremidades dos ossos longos e são compostas essencialmente por osso esponjoso, coberto por uma fina camada de osso cortical. A metáfise é a região de transição que junta a diáfise com a epífise, é onde ocorre o crescimento do osso. A diáfise é a porção média do um osso longo, composta por osso cortical e geralmente, contém medula óssea e tecido adiposo. Relativamente aos ossos curtos, planos ou irregulares não apresentam nem diáfise nem epífise, sendo apenas constituídos por osso esponjoso internamente e cercados externamente por osso compacto [12].

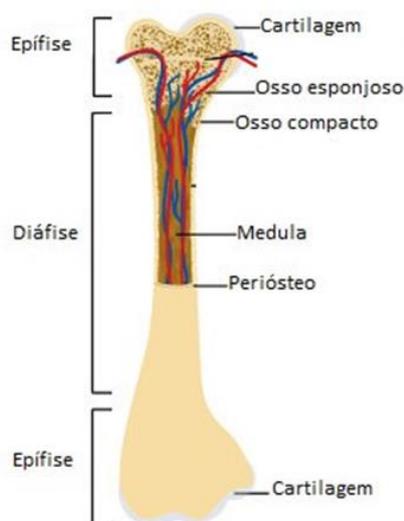


Figura 2 Estrutura biológica do osso [83].

A nível macroscópico, pode também ser observado que as superfícies externa e interna dos ossos longos, exceto nas cavidades articulares, são revestidas por uma camada de tecido conjuntivo chamada de perióstio e endóstio, respetivamente. Estas membranas possuem como função alojar as células osteoprogenitoras [1][2].

Micoestruturalmente, o osso cortical possui como estrutura elementar o osteónio ou sistema de Havers, constituído por colunas cilíndricas. Todos os osteónios

estabelecem ligação entre si através de canais perpendiculares, os canais de *Volkman*, que permitem a nutrição e difusão de células ósseas [2]. Cada osteónio é formado por cerca de 5 a 15 lamelas ósseas concêntricas, distribuídas à volta do canal o canal de Havers, que é revestido por endóstio e ocupado por elementos vasculo-nervosos. As lamelas ósseas apresentam uma orientação perpendicular entre si, para conferir maior resistência ao osso. Entre as lamelas encontram-se lacunas ósseas ocupadas pelos osteócitos, que estabelecem comunicação entre si através de prolongamentos citoplasmáticos dentro de canalículos ósseos que atravessam as lacunas [1][2].

Quanto à microestrutura do tecido esponjoso, este é constituído por placas ósseas interligadas, denominadas trabéculas que são constituídas por lamelas ósseas. Entre as trabéculas existem espaços que são preenchidos por medula óssea e vasos sanguíneos (Figura 3).

A nível nanoestrutural, os constituintes mais relevantes são as fibras de colágeno, rodeadas e infiltradas por minerais que na sua maior parte são nanocristais de HAP.

Finalmente, a nível sub-nanoestrutural, podem ser identificadas as moléculas de colagénio entre outras proteínas orgânicas [1] [2].

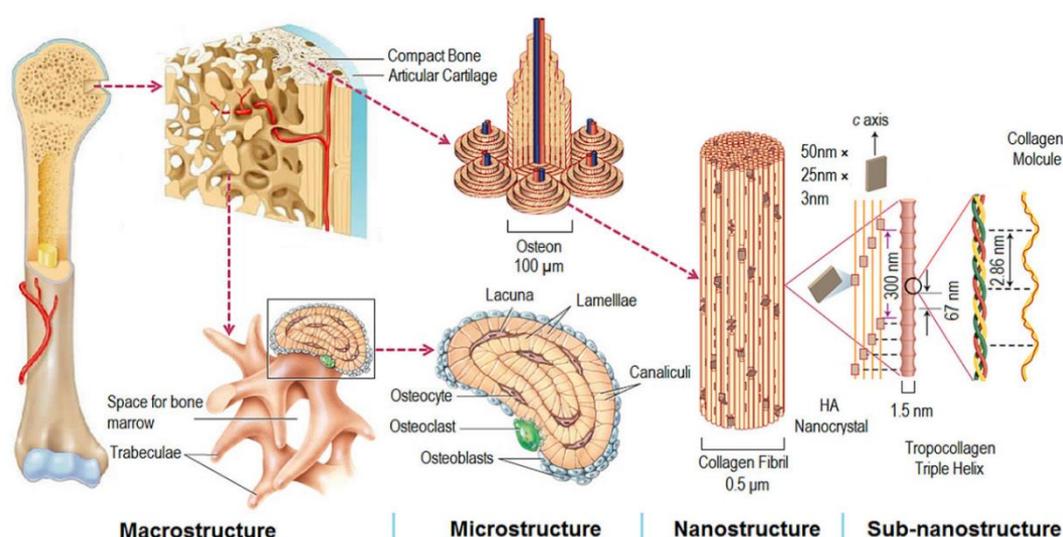


Figura 3 Hierarquia estrutural do osso [11].

1.2.2.2 Componentes celulares do tecido ósseo

As células ósseas são fundamentais nas funções desempenhadas pelo osso, e correspondem a cerca de 2% do total de tecido ósseo. Os quatro tipos de células (figura 4) que se encontram no tecido ósseo denominam-se por células osteogénicas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos [14]. As células osteogénicas ou células progenitoras osteocondrais são células estaminais que têm a capacidade de se transformar em osteoblastos. Estes tipos de células localizam-se na camada interior do pericôndrio, na camada interior do periosteio e no endosteio.

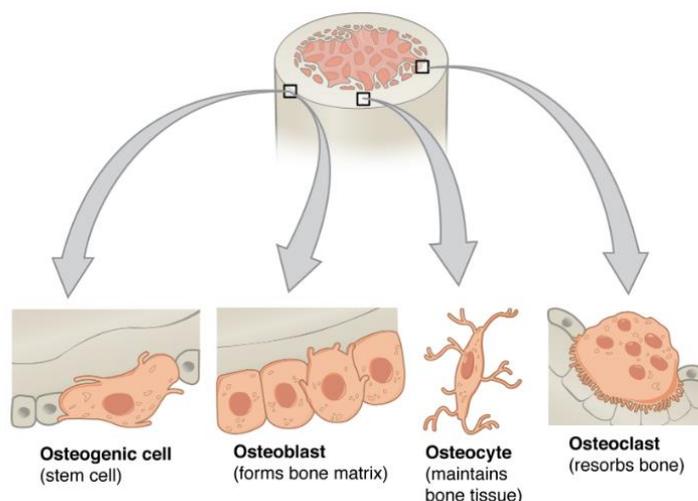


Figura 4 Representação esquemática da distribuição das diferentes células ósseas [15].

Os osteoblastos encontram-se na superfície óssea e desempenham um papel fundamental na formação de novo osso, fenómeno conhecido por osteogénese. Estas células são capazes de produzir colagénio e proteoglicanos, que são armazenados nas vesículas do aparelho de *Golgi* e posteriormente são libertados da célula por exocitose. Além disso formam vesículas que acumulam iões de cálcio e fosfato, bem como outras enzimas. Este conteúdo das vesículas é libertado das células através da exocitose, sendo usado na formação dos cristais de HAP. Desta forma, através destes processos biológicos é formada a matriz óssea mineralizada [3].

Os osteoblastos ao envolverem-se completamente na matriz óssea mineralizada, tornam-se assim em células maduras designadas de osteócitos. Os espaços ocupados por estas células chamam-se lacunas. Estas células comunicam entre si com as células da superfície óssea através de pequenos canais denominados

por canalículos, permitindo a passagem de nutrientes e de outras substâncias. Os osteócitos têm a função de captar as alterações da matriz óssea e os estímulos mecânicos que atuam sobre o osso, transmitindo estas informações às células da superfície para ativar os processos de remodelação óssea, sempre que estes sejam necessários [12].

Em relação aos osteoclastos apresentam-se como células grandes com vários núcleos e são responsáveis pela reabsorção do osso. A primeira fase da reabsorção óssea consiste na produção de um meio ácido através do bombeamento de íons de hidrogénio, que provoca a descalcificação da matriz. Na segunda fase, os osteoclastos produzem enzimas que degradam a camada de matriz orgânica não mineralizada que normalmente reveste o osso [3].

1.2.2.3 Remodelação óssea

O tecido ósseo encontra-se em constante mudança pois tem a capacidade de se remodelar continuamente ao longo da vida. A remodelação óssea é um processo dinâmico que resulta de um equilíbrio entre a remoção do osso velho e a formação de osso novo, através da ação dos osteoclastos e dos osteoblastos, respetivamente. Este processo, que está esquematizado na figura 5, apresenta fases distintas através da sequência de processos biológicos descritos seguidamente [15].

A primeira fase denomina-se por fase de ativação. Esta fase inicia-se em resposta a estímulos, desenvolvendo-se diversos sinais para a ativação e diferenciação das células precursoras dos osteoclastos. Simultaneamente as células de revestimento ósseo digerem a membrana endosteal, expondo assim a superfície óssea aos osteoclastos [15]. A segunda fase consiste na reabsorção e ocorre quando os osteoclastos se diferenciam dos seus precursores e reabsorvem o osso, formando cavidades como lacunas de *Howship* no osso trabecular e, cavidades de reabsorção no osso cortical. Esta fase termina com a morte celular dos osteoclastos, garantindo que não ocorra reabsorção excessiva. Na fase de reversão, após a reabsorção mediada por osteoclastos, as células mononucleares removem os restos de colagénio e preparam a superfície óssea para a deposição de tecido ósseo. Em relação à fase de formação, os osteoblastos depositam o novo osso, até perfazer o osso reabsorvido. Na finalização do processo de remodelação óssea, após a mineralização da nova

matriz óssea, alguns osteoblastos incorporaram-se na matriz mineralizada e diferenciam-se em osteócitos, enquanto outros dão origem a células de revestimento [15].

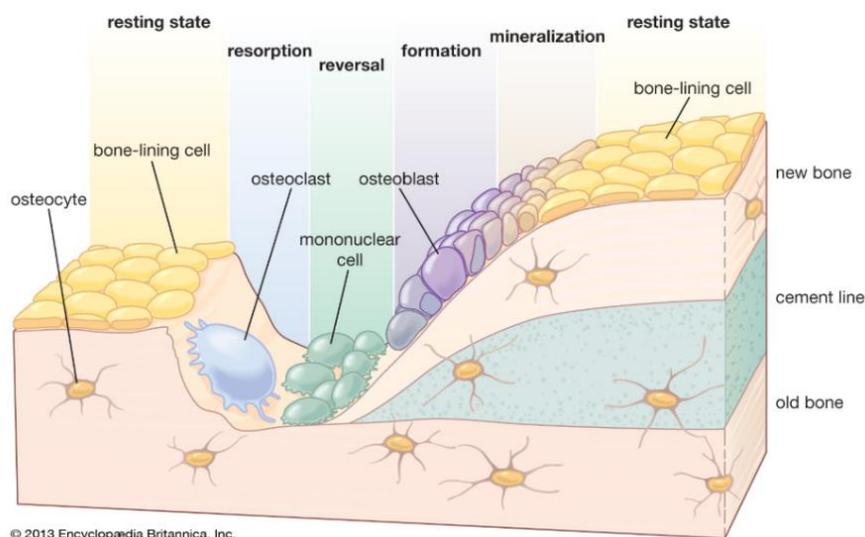


Figura 5 Figura representativa do processo biológico de remodelação óssea [17].

1.2.2.4 Propriedades mecânicas do tecido ósseo

Devido ao facto de o osso ser um tecido altamente adaptável, as suas propriedades mecânicas variam entre os indivíduos, com a idade, de acordo com a sua localização no corpo e devido a doenças. Os valores aproximados das propriedades mecânicas destes tipos de tecidos ósseos encontram-se descritos na tabela seguinte [2]:

Tabela 1 Propriedades mecânicas do osso cortical e esponjoso.

Propriedade	Ossó Cortical	Ossó Esponjoso
Força compressiva (MPa)	100-230	2-12
Resistência à tração, flexão (MPa)	50-150	10-20
Tensão de deformação (%)	1-3	5-7
Modulo de Young (GPa)	7-30	0,5-0,05

1.2.3. Biomateriais para a regeneração óssea

A resposta dos tecidos ao contacto com o material é um dos aspetos mais importantes na altura de se proceder à escolha do biomaterial a utilizar no implante. Tendo em consideração esta interação, os biomateriais podem ser categorizados em três gerações distintas, que correspondem ao seu processo evolutivo ao longo do tempo. A primeira geração de biomateriais surgiu na década de 60 e é composta por materiais bioinertes, caracterizados por interagirem minimamente com os tecidos circundantes. Esta geração inclui metais (como titânio ou ligas de titânio), polímeros sintéticos (como PMMA e PEEK) e cerâmicos (como alumina e zircónia). A segunda geração engloba materiais bioativos e biodegradáveis. Esta geração inclui os polímeros sintéticos e naturais, fosfatos de cálcio, carbonato de cálcio, sulfatos de cálcio e vidros bioativos. Em relação à terceira geração, esta tem por base o objetivo de induzir respostas celulares específicas ao nível molecular, conciliando a bioatividade e a biodegradabilidade da geração anterior [1].

Além dessa abordagem de classificação de biomateriais, estes de uma forma geral podem também ser classificados quanto à sua origem, que pode ser natural ou sintética. Os biomateriais sintéticos são classificados como metais e ligas, cerâmicos e vidros, polímeros e compósitos. Na tabela seguinte estão representados de forma resumida as diferentes propriedades das várias classes de biomateriais sintéticos, bem como algumas das suas respetivas aplicações [16].

Tabela 2 Propriedades e aplicações de biomateriais [16][17].

BIOMATERIAL	VANTAGENS	DESVANTAGENS	APLICAÇÕES
POLÍMEROS	Fácil de fabricar, baixa densidade, elasticidade.	Baixa resistência mecânica, fácil degradação.	Suturas, artérias, veias, tendões artificiais, maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); tendão artificial; oftalmologia, implantes.
METAIS E LIGAS	Ductilidade, resistência mecânica elevada, alta resistência a desgaste, energia de deformação alta e baixo custo.	Baixa biocompatibilidade e resistência à corrosão, perda das propriedades mecânicas em presença de tecidos conjuntivos moles.	Materiais de fixação ortopédica (parafusos, placas e fios), próteses articulares, implantes dentários.
CERÂMICOS E VIDROS	Biocompatibilidade, resistência à corrosão, quimicamente inerte, baixa condutividade térmica e elétrica.	Baixa força de tensão, alta densidade, baixa elasticidade, propriedades de difícil reprodução, bem como o seu fabrico.	Ferramentas médicas, ossos dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traqueias artificiais.
COMPÓSITOS	Boa compatibilidade, quimicamente inertes, resistência à corrosão.	Reprodução difícil.	Válvulas cardíacas, implantes, implante do joelho, articulações artificiais.

No entanto, apesar das inúmeras vantagens dos biomateriais sintéticos, estes apresentam ainda algumas lacunas, tais como a estrutura e composição não ser semelhante aos tecidos/órgãos nativos. Para superar estas debilidades, os biomateriais de origem natural surgem como uma opção promissora e sustentável para aplicações em engenharia de tecidos. Os biomateriais naturais têm vindo a sobressair por poderem comportar-se de forma semelhante à MEC em termos de biocompatibilidade, biodegradabilidade e funções biológicas inerentes, características estas que podem torná-los adequados para diversas aplicações biológicas. Estes biomateriais podem incluir vários minerais (como carbonato de cálcio, fosfatos de cálcio, sílica) e diversos polímeros, baseados em proteínas ou em polissacarídeos ou hidratos de carbono (figura 6) [18].

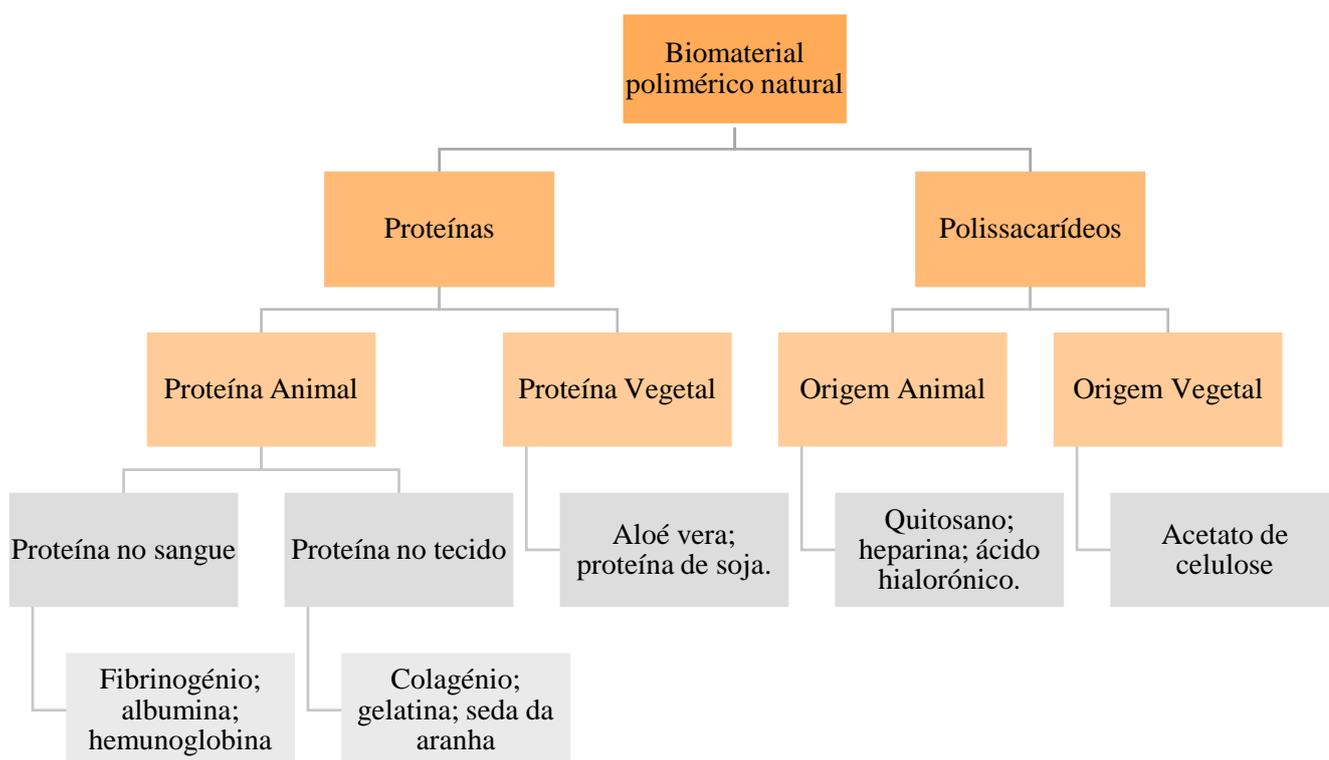


Figura 6 Esquema de biomateriais poliméricos e respetiva fonte natural [21].

Dentro dos polímeros naturais, o colagénio, o ácido hialurónico, o quitosano e o alginato são atualmente os mais requisitados na área de engenharia de tecidos [19]. O colagénio, devido às suas características não tóxicas, biocompatíveis e bioabsorvíveis apresenta um grande potencial relativamente à regeneração de tecidos adiposos [20]. O ácido hialurónico é muitas vezes utilizado como veículo para as células regenerarem vários tecidos. É um biomaterial desejável porque não é antigénico, o que faz com que não promova reações inflamatórias [21]. O quitosano é um dos biomateriais com maior potencial de utilização na medicina regenerativa. Desde fios de suturas, a biomateriais de aplicação na pele, osso e cartilagens, existem diversas possibilidades de utilização deste polímero natural. Este polímero mostrou ser biodegradável, biocompatível e um excelente agente hemostático e analgésico com propriedades antioxidantes [22]. Em relação ao alginato, este apresenta particular interesse para uma ampla gama de aplicações como biomaterial e especialmente como matriz de suporte para reparação e regeneração de tecidos. As suas excelentes propriedades em termos de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não

antigenicidade, fazem do alginato amplamente utilizado em uma variedade de aplicações biomédicas, incluindo engenharia de tecidos, administração de drogas e em algumas formulações para prevenir o refluxo gástrico [23].

Alguns polímeros naturais, como a biosílica e quitina, podem ser encontrados em animais de origem marinha, como é o caso das EM. Neste sentido, dada a riqueza da biodiversidade da ecologia marinha, e ao facto de ainda se encontrar pouco explorada, estes recursos surgem como uma fonte atraente para a obtenção de compostos promissores no desenvolvimentos de novos produtos farmacêuticos e dispositivos biomédicos [24].

Dadas as vantagens singulares que cada um dos materiais apresenta é considerada uma boa estratégia para alcançar as expectativas inerentes aos biomateriais, a combinação destes de modo a satisfazer um maior numero de necessidades biológicas. Nesse sentido, na construção de *scaffolds*, utilizam-se atualmente materiais de natureza muito variada, incluindo polímeros de origem sintética ou natural e materiais cerâmicos. etc.

1.2.3.1 Esponjas Marinhas

Entre os organismos marinhos, as EM surgem com grande potencial a nível terapêutico em diversas aplicações devido ao facto de possuírem constituintes químicos que permitem obter propriedades antitumorais, antivirais, anti-inflamatórias e antibióticos [25]. Estes animais sésseis pertencem ao filo porífera e dentro deste grupo, podem ainda ser subdivididos em 4 classes: a *Demospongiae*, *Homoscleromorpha*, *Hexactinellida* e *Calcarea*.

- ***Demospongiae***: representa a classe mais diversificada que reúne cerca 83% do total de esponjas, incluindo espécies marinhas e espécies de água doce. O esqueleto é formado por espículas de sílica amorfa, hidratada e não cristalina, podendo também apresentar um esqueleto de fibras de colagénio ou uma combinação de elementos orgânicos e inorgânicos [25] [26].
- ***Homoscleromorpha***: classe mais pequena do filo porífera, estas espécies têm como principais características a presença de uma membrana basal de colagénio tipo IV na pinacoderme [25]. Apresentam uma forma achatada e

possuem cores variadas, como azul, verde, amarelo ou vermelho. As esponjas desta classe são encontradas normalmente em ecossistemas escuros ou semi-escuros (como cavernas, saliências, substrato coralino) e em águas rasas [25][26];

- **Hexactinellida:** conhecidas também por “esponjas de vidro”, devido à semelhança da sua estrutura ao vidro [26][24]. Estas espécies são exclusivamente marinhas e são comuns em águas mais profundas e em ambientes polares. Possuem esqueleto composto por espículas siliciosas que atingem por vezes comprimentos superiores a 2 metros. Em algumas espécies, as espículas podem fundir-se durante a formação, compondo uma rede rígida [26];
- **Calcarea:** as esponjas que pertencem a este grupo são relativamente pequenas e apresentam um esqueleto mineral composto essencialmente de carbonato de cálcio, podendo fundir-se em algumas espécies [25]. O sistema aquífero das esponjas desta classe varia em relação à complexidade, desde o mais simples (*asconóide* e *syconoid*) ao mais complexo (*leuconoide*) [26].

Na figura seguinte (figura 7) encontra-se representados alguns exemplos de EM com diversas formas, cores e tamanhos correspondentes a cada uma das classes mencionadas [27].



Figura 7 Exemplos de EM das diferentes classes do filo porífera. (a) *Aplysina cavernicola*, (b) *Ephydatia fluviatilis*, (c) *Xestospongia muta*, (d) *Sycon ciliatum*, (e) *Clathrina contorta*, (f) *Leucosolenia complicata*, (g) *Rosella nuda*, (h) *Oopsacas minuta* e (i) *Oscar*.

As EM apresentam-se como organismos que se alimentam através de filtros muito eficientes, compostos por uma rede de canais e câmaras condutoras de água, revestidas com células flageladas. Através destas células são geradas correntes de água necessárias para permitir a atividade de filtração das esponjas [25]. Estruturalmente, as esponjas, possuem uma arquitetura porosa interconectada eficiente, composta por uma camada epitelial unicelular (pinacoderme) que cobre uma MEC feita de colagénio fibrilar, que contém células especializadas e componentes esqueléticas [26].

Os esqueletos das EM podem conter diferentes materiais na sua constituição, dependendo da espécie. No entanto, a biosílica, o polifosfato, a espongina e a quitina são os constituintes principais na maioria das espécies. Estes materiais encontram-se já descritos na literatura como possuindo elevado potencial para aplicações em engenharia de tecidos ósseos [24]. As suas principais características são descritas seguidamente.

- **Biosílica**

As EM, pertencentes às classes *Demospongiae* e *Hexactinellida*, são os únicos organismos que têm a capacidade de sintetizar enzimaticamente a sílica (SiO_2), para produzir esqueletos e espículas com características fortes e flexíveis, fornecendo proteção contra os predadores e atuando como sensores [10][24]. A formação destes elementos estruturais é realizada através de condições fisiológicas naturais, cujo valor de pH é em torno de 8,2, salinidade de 30 a 35 g/kg e as temperaturas variam de 22 a 30 °C [25]. A biosílica das esponjas apresenta um elevado teor de água (6% a 13%) e para além de silício (Si) e oxigénio, contém pequenas quantidades de Al, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Na, S e Zn [28]. Relativamente às espículas de biosílica das EM, foram realizados vários testes, que mostram que o material é nanoparticulado e é depositado em camadas, tendo tendência para formar uma estrutura biológica única e organizada [29].

- **Polifosfato**

Os polifosfatos são polímeros inorgânicos constituídos por resíduos de ortofosfato unidos por ligações de fosfoanidreto [30]. Este polímero surge nos esqueletos das EM como pequenos aglomerados brancos, também conhecidos por grânulos. Aglomerados estes que se desenvolvem quando a água do mar é processada através do sistema de canais de água das esponjas, permitindo a cooperação das bactérias na captura de fósforo e integrando-o na esponja em forma de polifosfato [25].

- ***Espingina***

As EM, tal como referido anteriormente, apresentam um nível simples de organização constituído por tipos de células especializados (coanócitos e pinacócitos). Essas células fazem parte de uma rede de matriz complexa semelhante ao colagénio (colagénio do tipo XIII nos mamíferos), denominando-se como espongina [31].

De acordo com investigações morfológicas e bioquímicas foram reveladas semelhanças entre a matriz da esponja e as matrizes extracelulares de vertebrados, bem como a orientação das fibras de colagénio no esqueleto da esponja e do osso trabecular humano. Através dessas semelhanças, o colagénio de fontes alogénicas e xenogénicas tem sido utilizado como matriz para o desenvolvimento de scaffolds para reparação de tecidos [32].

- ***Quitina***

A quitina apresenta-se como o segundo biopolímero mais abundante e é um componente presente na parede celular de alguns fungos, mas sobretudo em estruturas esqueléticas dos artrópodes, fazendo parte também das EM. Este biopolímero contém boas propriedades mecânicas, é termoestável, natural, não tóxico, biocompatível e biodegradável [24].

Recentemente, foi reportado a utilização EM *Ianthella labyrinthus* como uma nova fonte promissora para a produção de *scaffolds 3D* de quitina. Com base nos resultados obtidos foi sugerido que estas construções podem ser exploradas na substituição de fragmentos danificados da pele, ou como alternativa aos curativos incluindo aplicação após tratamentos de cirurgia plástica [33].

1.2.3.2 Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio são materiais amplamente estudados e explorados como biomateriais na formação e regeneração de tecido ósseo, uma vez que possuem características estruturais semelhantes, tanto em termos da composição química como das propriedades físicas [34]. Assim sendo, existiram grandes expectativas em explorar o uso de fosfatos de cálcio para a induzir a reparação do tecido ósseo de forma mais eficaz [35].

A vasta família dos fosfatos de cálcio, onde se inclui a HAP, o fosfato de tricálcico (TCP) e os vidros bioativos, pertencem à classe dos cerâmicos, materiais do tipo inorgânico produzidos a partir da sinterização de sais não metálicos [24] [36]. Dado que, em alguns casos, a superfície torna-se biologicamente compatível e favorece o crescimento ósseo, estes materiais passaram a designar-se por biocerâmicos [36]. Estes materiais apresentam pelo menos uma de três propriedades que os tornam relevantes em âmbito biológico, que são, a osteoindutividade, osteocondutividade e a biodegradabilidade [37].

- **Biodegradabilidade:** consiste na capacidade que o biomaterial tem de se degradar gradualmente ao longo do tempo em ambiente biológico e ser substituído por tecidos naturais de forma controlada e ajustada;
- **Osteoindutividade:** tem a função de estimular as células progenitoras a diferenciarem-se em linhagens osteoblásticas;
- **Osteocondutividade:** consiste na capacidade de o material garantir suporte para a difusão e ancoragem superficial e/ou interna das células ósseas, promovendo assim o crescimento acelerado do novo tecido ósseo [38].

Estas duas últimas propriedades são bastante relevantes para a adesão e proliferação celular. Sendo que, a adesão celular é também influenciada pela capacidade do material em adsorver proteínas constituintes da MEC. Assim sendo, as características dos fosfatos de cálcio, tais como a rugosidade da superfície, cristalinidade, solubilidade, conteúdo da fase, porosidade e energia da superfície tem uma relevância fundamental neste processo biológico [39]. Portanto, torna-se assim relevante controlar essas características de modo a selecionar os fosfatos de cálcio com propriedades adequadas para aplicações específicas. Uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio é a sua solubilidade em água e acidez (quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade e acidez), que conjugadas com diferentes proporções molares de cálcio e fosfato, permite a sua distinção em diversas fases minerais (tabela 3) [40].

Tabela 3 Fases de fosfatos de cálcio.

Nome	Abreviatura	Fórmula	Ca:P
Fosfato tetracálcico	TetCP	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatite	HAP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,2-2,2
Fosfato tricálcico	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Hidrogenofosfato de cálcio anidro	DCPA	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	CPPD	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico	HCP	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico	TDHP	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_7)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio	CMP	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Dentro da família de fosfatos de cálcio, a HAP destaca-se como sendo o maior constituinte dos componentes inorgânicos dos ossos humanos. Este fosfato de cálcio apresenta elevada estabilidade, com baixa solubilidade em ambientes fisiológicos definidos pela temperatura, pH, dos fluidos corporais, permitindo, no entanto, a nucleação de minerais ósseos. Nesse sentido, quando aplicada clinicamente não apresenta reações inflamatórias [39][41]. A HAP é também caracterizada por apresentar uma elevada biocompatibilidade e bioatividade, e desempenhar um excelente papel osteocondutor, porém não apresenta um papel osteoindutor [34].

Outro derivado de fosfatos de cálcio muito estudado é o TCP, que pode ser classificado em três diferentes fases, α , β e γ . Enquanto que o α -TCP apresenta uma estrutura cristalina com um grupo espacial do tipo monoclinico, γ -TCP e β -TCP têm uma estrutura cristalina com grupo espacial do tipo romboédrico [34]. Este último apresenta uma estrutura com maior estabilidade e uma taxa de biodegradação mais elevada em relação ao α -TCP [39]. Comparativamente à HAP, o β -TCP é menos

estável, apresentando assim uma taxa de degradação mais rápida e maior solubilidade. Além disso, apresenta uma taxa de reabsorção elevada e é amplamente utilizada para aumentar a biocompatibilidade. De forma a explorar ambas as características relevantes destes dois materiais de fosfatos de cálcio, foram desenvolvidos materiais bifásicos [39]. Os fosfatos de cálcio bifásicos têm sido essencialmente usados em enxertos ósseos como materiais de substituição óssea. A combinação da HAP e do β -TCP têm vindo a ser melhoradas de forma a estimular a diferenciação osteogénica de células-tronco mesenquimais, aumentar a adesão celular, anexar fatores de crescimento e melhorar as propriedades mecânicas [42].

Em geral, os fosfatos de cálcio, principalmente a HAP e TCP, têm sido muito utilizadas no ramo da biomedicina com grande sucesso devido às suas boas propriedades biológicas descritas anteriormente. No entanto, apesar das excelentes propriedades, os biocerâmicos de fosfatos de cálcio apresentam ainda algumas limitações relevantes que podem comprometer o seu desempenho em algumas aplicações biológicas. A sua fragilidade e a falta de elasticidade, induzem uma baixa estabilidade mecânica, limitando a sua utilização na regeneração de grandes defeitos ósseos. Os cerâmicos ao serem submetidos a esforços de tensão apresentam baixa resistência à fratura, limitando assim a utilização de fosfatos de cálcio em locais que apresentam essas condições. Os metais e polímeros por apresentarem boas propriedades mecânicas poderiam ultrapassar esta limitação, no entanto não exibem comportamento biológico adequado [34]. Nesse sentido, a incorporação destes materiais com fosfatos de cálcio tem sido um caminho que se tem vindo a desenvolver para colmatar as limitações observadas e melhorar o desempenho biológico [43]. Neste contexto, a HAP tem vindo a ser bastante explorada no recobrimento de *scaffolds* para obter estruturas bioativas. Por exemplo, novos materiais compósitos à base de estruturas 3D de ácido polilático co-glicólico (PLGA) recobertos por HAP foram desenvolvidos com o intuito de induzir elevada biocompatibilidade à matriz polimérica. Estudos *in vitro* com os materiais compósitos obtidos demonstraram sua elevada capacidade para o crescimento e proliferação de células humanas de osteoblastos [39].

1.2.4. Bionanocompósitos para regeneração óssea

A engenharia de tecidos ósseos é, hoje em dia, um campo em constante crescimento, recorrendo ao desenvolvimento de novos scaffolds para a regeneração de tecidos ósseos humanos através do recurso a novos materiais bioativos e diversas técnicas de produção [44]. Os materiais biocompósitos são constituídos por pelo menos dois componentes em que pelo menos um deles é de origem biológica. Estes são geralmente divididos em três classes de acordo com tamanho das partículas, macrocompósitos, microcompósitos e nanocompósitos. Os bionanocompósitos possuem pelo menos um dos componentes com dimensões na faixa de tamanho de nanométrica (<100 nanómetros) [45][1].

O uso de biomateriais nanoestruturados para regeneração óssea é inspirado na arquitetura óssea nativa. O osso apresenta uma estrutura nanocompósita orgânica e inorgânica complexa. A fase orgânica é composta principalmente de colagénio tipo I, que se encontra organizado em nanofibras que variam de 50 a 500 nm de diâmetro onde se encontra embebida na fase inorgânica, constituída maioritariamente por cristais de HAP com comprimentos de cerca de 100 nm, larguras de 20-30 nm e espessuras de 3-6 nm. Tendo em conta a contribuição da componente orgânica e inorgânica do osso, os fosfatos de cálcio têm vindo a ser amplamente estudados como agente de reforço em diversas matrizes orgânicas para serem explorados como biomateriais na formação e regeneração de tecido ósseo de elevado desempenho biológico. Os fosfatos de cálcio apresentam alguma fragilidade e falta de elasticidade e por isso induzem uma baixa estabilidade mecânica, limitando a sua utilização na regeneração de grandes defeitos ósseos. Nesse sentido, a fim de satisfazer as necessidades clínicas nas áreas de suporte de carga, diversas abordagens na síntese de nanocompósitos têm vindo a ser exploradas para melhorar as propriedades mecânicas dos fosfatos de cálcio. Uma abordagem bastante explorada tem consistido na síntese de novos biomateriais com recurso a misturas de materiais de origem natural. Por exemplo, as fibras naturais têm sido bastante usadas com o objetivo de melhorar as suas propriedades mecânicas ou biológicas, mimetizando a MEC do osso humano [46]. Devido às características biológicas das EM reportadas anteriormente, estas são consideradas excelentes candidatas para o desenvolvimento de matrizes biologicamente ativas [47].

Através da calcinação da EM *Petrosia ficiformis*, A. Barros et al [48] obtiveram uma estrutura biocerâmica tridimensional. O esqueleto desta esponja é composto por SiO_2 e não apresenta bioatividade. De modo a induzir esta propriedade e sem modificar a estrutura geral, esta foi submetida a dois tratamentos químicos, um alcalino e outro ácido, que permitiu alterar a constituição química da superfície de maneira a promover a precipitação de cristais de fosfatos de cálcio, quando imersos em SBF. Após a imersão da estrutura em SBF, foi observado que a morfologia da superfície apresentou a formação de um revestimento de fosfatos de cálcio, semelhante à HAP. Os estudos *in vitro* com uma linha celular osteoblástica (SaOS-2) demonstraram que a estrutura apresentava um elevado potencial para a adesão e o crescimento celular. Outro estudo realizado por Tomasz Szatkowski [47], permitiu demonstrar pela primeira vez a possibilidade do uso de *scaffolds* à base da EM, *Hippospongia communis*, como um modelo tridimensional para a deposição hidrotérmica de dióxido de titânio (TiO_2) cristalino (figura 8). O TiO_2 atua como um substrato inorgânico que permite a adesão de moléculas, proteínas e células na sua superfície, levando à formação óssea. Além disso, é reconhecido pela não toxicidade e pela estabilidade físico-química e térmica. Com base nos resultados deste trabalho, os autores verificaram que após o tratamento hidrotérmico, o revestimento obtido era uniforme e apresentava uma elevada adesão à superfície das fibras (figura 8). A forte adesão das nanopartículas inorgânicas ao *scaffold* foi descrito como sendo devido à presença de grupos funcionais originários da composição de aminoácidos do material.

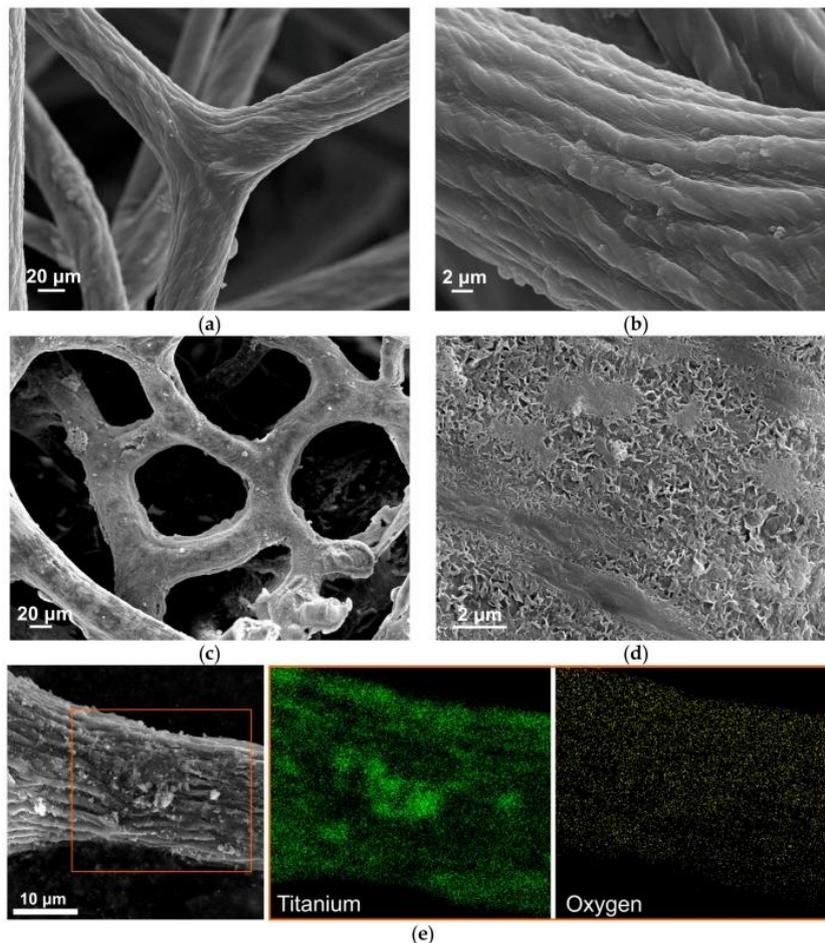


Figura 8 Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM). (a, b) fibras de esponja antes do tratamento hidrotérmico em butóxido de titânio (IV) (TBOT); (c, d) TiO_2 imobilizado na esponja (Spl- TiO_2) obtida por síntese hidrotérmica; (e) medições de espectros.

Além dos estudos relatados anteriormente, foi também desenvolvido um novo material compósito à base de esponjina e HAP com o objetivo de avaliar as suas características físico-químicas e morfológicas, bem como o seu desempenho biológico *in vitro*. Os resultados obtidos, permitiram verificar que o material compósito desenvolvido apresentava com uma relação similar à composição óssea, com 70% de HAP e 30% de esponjina, permitiu obter um comportamento biológico melhorado quando comparada com composição de 90% de HAP e 10% de esponjina. [49].

1.2.4.1 Bioestimulação físico/química

Muitos estudos têm vindo a revelar que os biomateriais podem promover de um modo mais eficiente o processo de regeneração óssea ao induzir a adesão, proliferação e diferenciação celular, sendo que atualmente se designam por

biomateriais inteligentes [50]. Dessa forma, é muito importante compreender os mecanismos de interações entre as células e a estrutura dos biomateriais, por forma a desenvolver estratégias específicas para a conceção e fabricação de novos biomateriais que podem induzir comportamento celular desejado. O comportamento celular quando ativado através de estimulação topográfica ou mecânica ocorre através dos seus recetores específicos, normalmente designados mecanosensores celulares (figura 9).

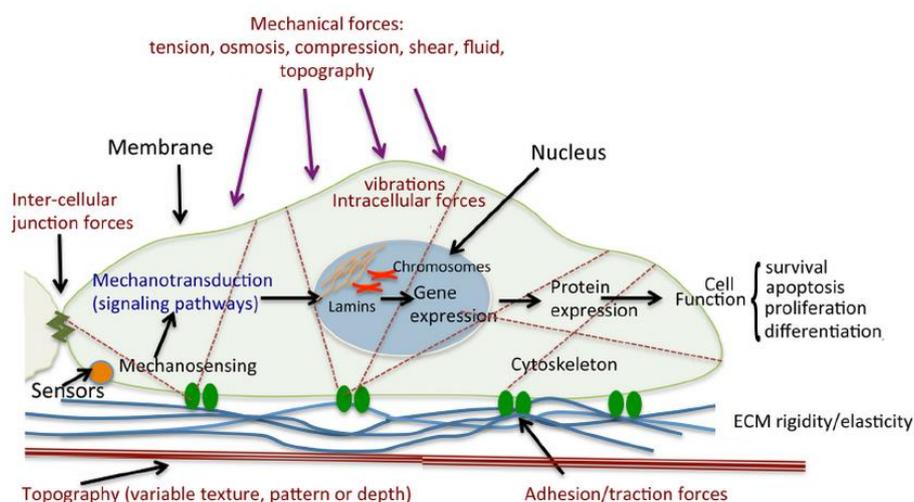


Figura 9 Diagrama esquemático da estimulação mecânica celular [65].

As células são sensíveis a diferentes tipos de forças: extracelulares, como forças de deformação através do fluxo de fluido sobre a superfície celular, forças de tração/deformação aplicadas através do microambiente (constituído pela matriz extracelular); ou intercelular, como por exemplo através do estabelecimento de interações com células vizinhas. A ativação dos sensores celulares através da aplicação de forças mecânicas leva ao início de um fenómeno denominado como mecanotransdução. Estes mecanismos (figura 9) quando devidamente controlados, podem alterar a forma, a atividade celular, a expressão génica através das interações entre a célula e a MEC, além disso, podem regular a migração, proliferação e diferenciação celular. Por outro lado, podem facilitar na transferência de compostos bioativos no local do defeito ósseo, bem como melhorar a fixação e a estabilidade do implante ósseo [51].

Em casos graves, como na reparação de grandes defeitos ósseos, ou na perda da função de tecidos, os sinais endógenos não são suficientes em tipo e/ou em quantidade para regenerar o tecido danificado. De forma a contornar esta situação é necessário que sejam adicionados sinais exógenos, para estimular e acelerar o processo de cicatrização, a engenharia de tecidos incorpora na abordagem biomimética o recurso a estímulos externos (bioquímicos /biofísicos) [52]. A nível de estímulos bioquímicos, foi verificado que determinadas moléculas/iões quando libertadas induzem a reparação óssea. Nesse sentido, diversos produtos que contêm fatores de crescimento têm vindo a ser amplamente utilizados neste contexto. De forma a investigar a capacidade de promover e acelerar a regeneração óssea foram já utilizadas diversas moléculas bioativas [53], proteínas [54], hormonas [55], anticorpos e ácidos nucleicos [56]. Por outro lado os sinais biofísicos, tais como a estimulação mecânica, rigidez da MEC e fluxo do fluido também mostraram ser promissores na perspectiva de melhorar a formação de tecido ósseo [52].

Neste contexto, os materiais implantados devem permitir que as células recebam os estímulos e que estas possam desenvolver uma resposta mais rápida e eficaz no processo de regeneração. Assim sendo, os *scaffolds* de bionanocompósitos têm grande potencial nesse processo, pois apresentam arquitetura adequada à fixação celular e a proliferação, como a cristalinidade do material, porosidade, tamanho e interconectividade dos poros. Estas estruturas de tamanho nano, aumentam os locais de fixação celular por apresentarem uma área de superficial maior para a adsorção de proteínas, comparativamente às estruturas com dimensões micro, em que as células se propagam nas estruturas como em sistemas bidimensionais [57]. As células cultivadas em superfícies de escala nano podem formar uma camada mais ordenada do que em superfícies planas e podem ter mais zonas de contacto, melhorando a fixação celular e as interações celulares. A porosidade do *scaffold*, bem como o tamanho dos poros, podem controlar o processo de adesão e migração das células à superfície dos *scaffolds*, e os poros interconectados permitem o crescimento e difusão das células dentro do *scaffold* e o fluxo de nutrientes [5].

1.3. Objetivos

O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de materiais nanocompósitos baseados na modificação superficial da matriz da EM, através do crescimento controlado de filmes finos de fosfatos de cálcio para aplicação na área da regeneração óssea. Para tal, a matriz de EM foi inicialmente caracterizada e purificada. A modificação da matriz foi realizada através do recurso a duas abordagens distintas. A primeira abordagem baseou-se no crescimento direto de fosfatos de cálcio na superfície da EM por imersão em SBF e a segunda abordagem recorreu à modificação prévia da superfície das EM com agentes de nucleação (molecular, polieletrólitos e polímeros naturais) para favorecer o crescimento de fosfatos de cálcio. Os novos materiais nanocompósitos desenvolvidos à base de EM/fosfatos de cálcio foram caracterizados em termos de composição química e estabilidade química e mecânica. Os materiais nanocompósitos mais promissores foram avaliados em termos de biocompatibilidade através de cultura in vitro com células de osteoblastos.

1.4. Estrutura

A presente dissertação está dividida em 8 capítulos. O capítulo 1 consiste na revisão bibliográfica e apresentação dos objetivos da tese. O capítulo 2 é intitulado por materiais e métodos, e apresenta de forma detalhada os materiais utilizados, os procedimentos experimentais explorados, bem como as técnicas de caracterização utilizadas. O terceiro capítulo explora a estrutura da EM e diversos processos de purificação. O quarto capítulo é dedicado ao crescimento controlado de fosfatos de cálcio na superfície da matriz da EM, através de incubação em SBF e 10xSBF. O quinto capítulo descreve os resultados obtidos através do crescimento de fosfatos de cálcio com modificação superficial prévia da matriz da EM. O sexto capítulo descreve os resultados obtidos respeitantes aos ensaios celulares realizados com as amostras EM mais promissoras. O sétimo capítulo corresponde à conclusão.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Neste trabalho foram utilizadas esponjas comerciais, denominadas por *Hippospongia communis* (Figura 10).

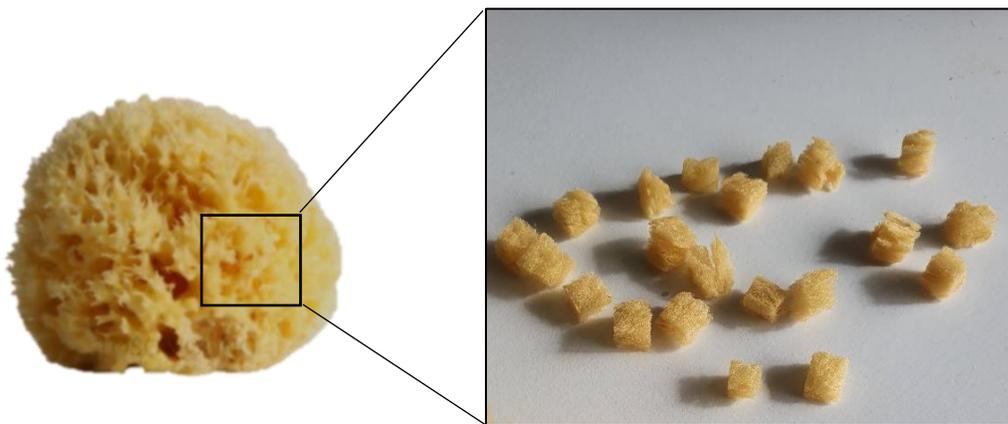


Figura 10 Amostras de *Hippospongia communis* comercial e cortadas com as dimensões de 5 mm³

2.2. Reagentes

Os reagentes utilizados para a preparação da solução SBF foram os seguintes: NaCl (Fluka, $\geq 99,5\%$), NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$), KCl (Sigma-Aldrich, $\geq 99,0\%$), Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, $\geq 99,0\%$), MgCl₂.6H₂O (Labkem, $\geq 99,0\%$), HCl(1N), CaCl₂.6H₂O (Sigma-Aldrich, $\geq 98,0\%$), Na₂SO₄ (Sigma Aldrich, $\geq 99,0\%$) e (CH₂OH)₃CNH₂ (Sigma Aldrich, $\geq 99,8\%$).

Na modificação superficial da matriz da EM foi utilizado a rhodamine B (Sigma, $\geq 95,0\%$), methylene blue (Sigma-Aldrich, $\geq 82,0\%$).

Relativamente aos reagentes utilizados nos testes biológicos foram os seguintes: alpha minimum essential medium (Sigma-Aldrich), penicillin (Sigma-Aldrich), streptomycin (Sigma-Aldrich), sodium bicarbonate (Sigma Aldrich), Phosphate-Buffered Saline (PBS, Sigma-Aldrich), cetylpyridinium chloride (Sigma-Aldrich) e paraformaldehyde (ACROS Organics).

2.3. Métodos

3.3.1 Purificação da matriz da EM

As amostras da EM foram cortadas com um volume de cerca de 1.25 mm³. Estas amostras apresentavam algumas impurezas e de modo a eliminá-las foi necessário proceder a uma purificação. Numa primeira abordagem, as amostras foram purificadas apenas por agitação durante 24 horas em água destilada (3 litros) em horas. Seguidamente, as amostras foram retiradas do goblé e colocadas na estufa à temperatura de 37°C, para secagem. Estas amostras foram designadas como EM_H₂O.

Numa segunda abordagem as amostras foram purificadas com uma solução de ácido clorídrico (HCl 0,5M) em agitação durante 24 horas (figura 11). Após este tratamento as amostras foram igualmente secas à temperatura de 37°C. Estas amostras foram designadas como EM_HCl.

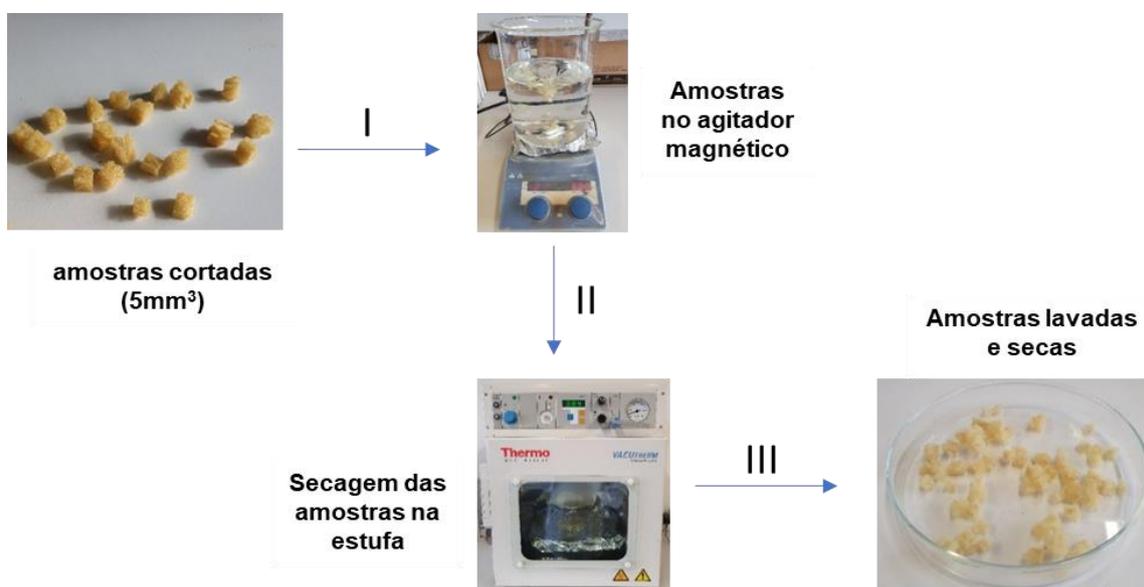


Figura 11 Processo de lavagem das amostras de EM.

2.3.2 Tratamento térmico das EM

Neste estudo as amostras de EM_HCl foram sujeitas a um tratamento térmico. As amostras foram colocadas na estufa em vácuo a uma temperatura de 180 °C durante 12 horas.

2.3.3 Método de modificação superficial das EM

2.3.3.1 Modificação por polieletrólitos

A modificação superficial da EM foi conduzida utilizando a combinação de polieletrólitos positivos e negativos. Nesse sentido, foram preparadas duas soluções de polieletrólitos, poli(etilenimina) (PEI) que tem carga positiva e poliestireno sulfonado (PSS) que tem carga negativa. Para preparar a solução de PEI com concentração de 2 mg/mL, foram dissolvidas 2,25 g da solução de PEI em 50 mL de água destilada por agitação. Em seguida colocou-se a solução diluída num balão volumétrico de 250 mL e adicionou-se água destilada até perfazer o volume total. A solução de PSS foi preparada com uma concentração de 5 mg/mL, através da diluição 6.94 mL de solução de PSS em 243.06 mL de água destilada num balão volumétrico de 250 mL.

Estes polieletrólitos, foram utilizados para recobrir as EM com multicamadas através da técnica *Layer-by-Layer (L-b-L)*, sendo este mecanismo governado por interações eletrostáticas. A primeira camada adicionada foi de PEI devido à carga superficial negativa das EM. Nesse sentido, a uma amostra de EM foi adicionada a 50 mL da solução de PEI, e, em seguida, a mistura foi agitada, durante 30 minutos, para promover as interações eletrostáticas do PEI com a superfície das EM. O excesso de PEI foi removido por lavagem em água destilada durante 30 minutos. A segunda camada adicionada foi de PSS, em que a amostra previamente modificada com PEI, foi colocada em agitação numa solução de 50 mL de PSS. Em seguida, a mistura ficou em agitação durante 30 minutos. Após o estabelecimento de interações eletrostáticas adsorção da segunda camada de polieletrólito negativo, o excesso foi removido através da lavagem em água destilada durante 30 minutos. Este procedimento PEI/PSS foi realizado durante 3 ciclos consecutivos, de modo a garantir uma modificação superficial efetiva da EM.

2.3.3.2 Modificação com biopolímeros

Nesta abordagem foram utilizados dois polímeros naturais, alginato e o quitosano. Para preparar a solução de alginato (2mg/mL), foi introduzido 200 mg de alginato num gobelé com 100 mL de água destilada. O polímero foi dissolvido numa solução de água destilada a 70°C através de uma placa de aquecimento com agitação. Após o polímero estar completamente dissolvido, foram introduzidas as amostras de EM em 30 mL desta solução, ficando a agitar durante 1 hora. Finalmente as amostras foram congeladas e posteriormente liofilizadas.

A solução de quitosano (2 mg/mL), foi preparada utilizando uma solução de ácido acético (0.5 M). Para preparar 100 mL dessa solução foi adicionado 0.6 mL de ácido acético a 99.4 mL de água destilada. Depois da solução estar preparada, foi utilizado 30 mL da mesma e adicionado 60 mg de quitosano, que ficou em agitação durante 12 horas. Após a total dissolução do polímero, foi introduzida uma amostra de EM que ficou em agitação durante 1 hora. Seguidamente as amostras foram congeladas e posteriormente liofilizadas.

2.3.3.3 Modificação com corantes

As EM foram modificadas através da adsorção de corantes. Neste estudo foram utilizados a rodamina B (RB) e azul de metileno (MB). Para esse efeito, as amostras de EM foram incubadas em 50 mL de solução de corantes (20 mg/L) durante 48 horas por forma a garantir a saturação a estrutura. Posteriormente as amostras foram lavadas com água destilada durante 24 horas em agitação vigorosa. Após lavadas, as amostras foram secas na estufa a 37°C.

2.3.4 Preparação da solução SBF e 10xSBF

De modo a preparar corretamente a solução SBF e 10xSBF é necessário que a adição dos reagentes que compõem cada solução seja feita segundo a ordem descrita na tabela 4.

Tabela 4 Ordem, reagentes e as respectivas quantidades para a preparação de 2 litros de SBF [62] e 10xSBF [63].

SBF			10xSBF		
Ordem	Reagentes	Quantidade	Ordem	Reagentes	Quantidade
1	NaCl	13,094 g	1	NaCl	116.8860 g
2	NaHCO ₃	4,536 g	2	KCl	0,7456 g
3	KCl	0,746 g	3	CaCl ₂ .2H ₂ O	7.3508 g
4	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,711 g	4	MgCl ₂ .6H ₂ O	2.0330 g
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,61 g	5	NaH ₂ PO ₂	2.3996 g
6	HCl (1N)	30 mL	-----	-----	-----
7	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,735 g	-----	-----	-----
8	Na ₂ SO ₄	0,142 g	-----	-----	-----
9	(CH ₂ OH) ₃ .CNH ₂	12,114 g	-----	-----	-----

Na preparação da solução SBF, após a adição dos reagentes e estes estarem devidamente dissolvidos, o valor de pH teve de ser ajustado ao valor de 7.35 por adição de HCl (1N), de modo a evitar a formação de precipitados [58]. A solução ficou límpida após a preparação e permaneceu assim no recipiente armazenado no frigorífico, por um período máximo de 30 dias. Em relação à preparação da solução 10xSBF, após todos os reagentes mencionados na tabela 4 estarem dissolvidos pela ordem descrita, a solução foi ajustada até perfazer os 2 L com a adição de água desionizada [59]. Posteriormente foi adicionado HCl para ajustar o valor de pH a 4,35-4,40. A solução final ficou perfeitamente límpida e foi armazenada num recipiente no frigorífico, por períodos máximos de 30 dias. Para a solução 10xSBF estar devidamente preparada, aquando da sua utilização deve ser adicionado 0.168 g de NaHCO₃, a 200 mL da solução inicial, o que provoca um aumento de pH até 6.40.

2.3.5 Condições de imersão e análise

Cada ensaio foi realizado em 20 mL de solução SBF. Cada amostra de EM foi imersa em SBF e mantida em estufa à temperatura de 37 °C durante o período de incubação 7, 14 e 30 dias. Estes ensaios foram realizados em triplicado para cada tempo de incubação.

Os ensaios para a solução 10xSBF foram realizados nas mesmas condições experimentais descritas para os ensaios realizados em solução SBF. Os períodos de incubação das amostras em solução 10xSBF foram mais curtos, de 12, 24 e 48 horas e 5 dias. Os parâmetros de incubação estudados nesta solução foram o tempo, a temperatura e a agitação

2.4. Ensaio Celulares

Foi utilizada uma linha celular osteoblástica MC3T3-E1 (ATCC CRL-2593). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera humidificada de 5% de CO₂ em ar, *L-glutamine* e *sodium pyruvate* contendo *Alpha Minimum Essential Medium* suplementado com 10% (v / v) de *fetal bovine serum* (FBS, Sigma-Aldrich), solução de *penicillin/streptomycin* a 1% (v / v) (contendo 10.000 unidades de *penicillin* e 10 mg de *streptomycin* / mL) e 2,2 g / L de bicarbonato de sódio. O meio era atualizado duas vezes por semana. As células foram colhidas na pré-confluência usando solução de *trypsin/EDTA* a 0,25% (Sigma-Aldrich). Antes das células serem semeadas, os *scaffolds* foram esterilizados em solução aquosa de etanol 70% (v / v) por 4 horas, lavados em solução *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, 1x, Sigma-Aldrich) 3 vezes, incubados em meio de cultura completo por 1 hora e colocado em uma placa de 48 poços. Em seguida, as células MC3T3-E1 foram semeadas nos *scaffolds* a uma densidade inicial de 100.000 células / *scaffold*, seguido por uma incubação a 37°C por 2 horas. Posteriormente, foi adicionado meio fresco, e os *scaffolds* com as células semeadas foram cultivados por 7 dias, com duas mudanças médias por semana.

2.4.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi calculada com base na atividade metabólica dos *scaffolds* carregados de células após 1, 3 e 7 dias de cultura, medida por um método de

resazurina. Uma solução de resazurina (0,1 mg / mL em PBS; ACROS Organics) foi adicionada ao meio fresco a uma concentração final de 10% (v / v). Os *scaffolds* foram incubados nesta solução a 37°C por 5 horas no escuro, após o que 100 µL por poço foram transferidos para uma placa de 96 poços e a absorbância a 570 e 600 nm foi medida em um leitor de microplacas (Synergy HTX).

Para cada dia, os valores finais de absorvância para cada amostra foram calculados como a razão Abs570 / Abs600 nm menos a razão Abs570 / Abs600 nm de um controle negativo (estrutura sem células). Os valores de absorbância do mesmo número de células incubadas no poliestireno de cultura de tecidos (TCPS) no primeiro ponto de tempo foram tomados como 100% e a percentagem de células viáveis foi calculada com base nesses valores de controle.

2.4.2 Morfologia celular

A morfologia celular foi avaliada por meio de visualização SEM após 7 dias de cultura. Os *scaffolds* semeados com MC3T3- E1 foram fixados com 4% (wt / v) de *paraformaldehyde* em PBS e lavados com PBS. As amostras foram posteriormente desidratadas com concentrações graduadas de soluções aquosas de etanol (50, 70, 90, 96 e 100% v / v, Panreac AppliChem), tratadas com *hexamethyldisilane* e mantidas no exaustor para secagem ao ar. Finalmente, as amostras foram montadas e observadas por SEM usando um *Hitachi TM4000 plus* a uma tensão de aceleração de 10 kV.

2.4.3 Mineralização

O ensaio de mineralização (Alizarin Red Staining, Sigma-Aldrich) foi realizado após 7 dias de cultivo. Resumidamente, *scaffolds* semeados MC3T3-E1 foram fixados em 4% (wt / v) *paraformaldehyde* em PBS, permeabilizados com 0,1% Triton X-100 em PBS, enxaguados com PBS e corados com 40 mM de Alizarin Red Staining em agitação por 20 minutos com um agitador orbital, após a qual a mancha de Alizarin Red Staining foi removida. Posteriormente, *Cetylpyridinium chloride* 0,1 M foi adicionado às amostras coradas por 1 hora durante a agitação com um agitador orbital para libertar a Alizarin Red Staining dos suportes semeados de células. Triplicados de 100 µL do sobrenadante remanescente foram transferidos para uma placa de 96 poços e lidos a 570 nm com um leitor de microplacas (Synergy HTX).

2.5. Técnicas de caracterização

Para o desenvolvimento deste trabalho, as técnicas de caracterização utilizadas para caracterizar o as amostras de EM são descritas de seguida.

2.5.1 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A análise morfológica das EM foi realizada através do microscópio eletrónico de varrimento, o *SEM Hitachi TM4000Plus* a uma tensão de aceleração de 15 kV. O SEM tem a capacidade de obter imagens da superfície dos objetos com elevada resolução. Esta técnica utiliza um feixe de eletrões de alta energia, focado e monocromático, que é acelerado através de um campo elétrico positivo antes de incidir na amostra a analisar. Os eletrões ao interagir com a amostra poderão resultar em eletrões secundários, retrodifundidos ou eletrões de *Auger*, assim como em raios-X característicos e fótons. Nesta técnica os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os eletrões secundários e os retrodifundidos. Conforme o feixe de eletrões primário vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os eletrões secundários fornecem a imagem da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução [60].

2.5.2 Espectroscópio de raios-X por dispersão em energia (EDS)

O EDS, *Bruker QUANTAX 400*, tem como objetivo identificar a composição elementar da amostra a analisar. Quanto à forma de aquisição dos resultados, são obtidos através dos raios-X emitidos a partir da amostra, durante o bombardeamento realizado pelo feixe de eletrões. Seguidamente através detetor de raios-X são medidos os raios-X emitidos versus sua energia, que é característica do elemento químico do qual o raio-X foi emitido [61].

2.5.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi realizado através do equipamento *FTIR System PerkinElmer*, apresentado na figura 12. Esta técnica estuda as interações da radiação infravermelha com uma amostra e tem como objetivo a deteção de grupos funcionais presentes na amostra. Como os grupos funcionais da amostra absorvem a radiação em frequências

e intensidades específicas, é possível a identificação de componentes e estruturas moleculares específicas [62]. Os espectros foram adquiridos através de 128 varrimentos por espectro e uma resolução espectral de 4.0 cm^{-1} na gama de número de onda de $400\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$.

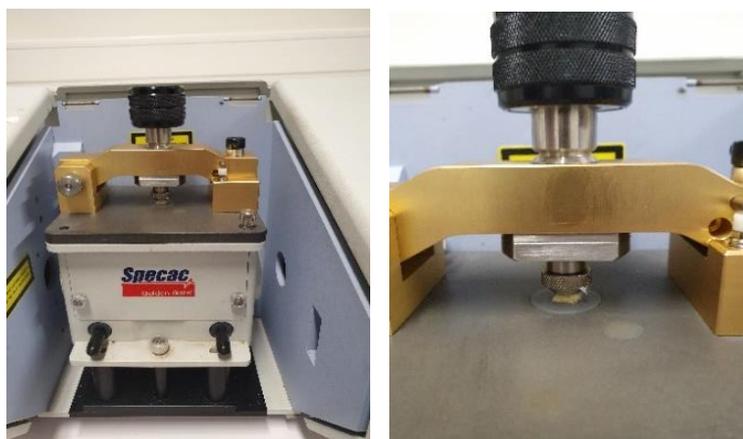


Figura 12 Realização da caracterização das amostras de EM através do FTIR.

2.5.4 Difração de Raios-X (DRX)

A DRX é uma técnica não destrutiva, utilizada para caracterizar materiais cristalinos. Esta técnica fornece informações sobre estruturas, fases, orientações preferenciais de cristal (textura) e outros parâmetros estruturais, como tamanho médio de grão, cristalinidade, tensão e defeitos de cristal. Os picos de DRX são produzidos por interferência construtiva de um feixe monocromático de raios-X espalhados em ângulos específicos de cada conjunto de planos de rede em uma amostra [61].

Os difratogramas de raios-X das amostras de EM foram obtidos à temperatura ambiente num difractómetro *Rigaku Smartlab SE* usando radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1.5405\text{ \AA}$) a 40 kV e 30 mA . Os difratogramas foram adquiridos de $10^\circ < 2\theta < 60^\circ$ com uma velocidade de varrimento de $3^\circ/\text{min}$ e com um passo de $0,02^\circ$.

2.5.5 Termogravimetria (TGA)

A TGA é uma das técnicas mais utilizadas determinar a degradação térmica das substâncias químicas [63]. Os dados desta técnica são obtidos através da perda de massa em função da temperatura, permitindo estudar o comportamento da degradação térmica das amostras a testar, bem como possíveis interações químicas

a temperaturas elevadas. Além disso, esta técnica permite obter informação sobre análise da composição de materiais com vários componentes, estabilidade térmica e estabilidade oxidativa.

Desta forma, a TGA foi uma das técnicas usadas para analisar as amostras de EM e foi realizada em atmosfera de ar a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, desde a temperatura de 5°C até 500 °C e os resultados foram adquiridos através do equipamento Netsch Jupiter TGA/DSc, *Netsch –Jupiter STA 449 F3*.

2.5.6 Microtomografia de raios-X (Micro-CT)

A Micro-CT consiste na aquisição de projeções de raios-X em diferentes ângulos da amostra a analisar. O tratamento matemático dessas projeções permite obter uma imagem tridimensional da amostra e também determinar a microestrutura e a morfologia da amostra [64]. O equipamento utilizado para a aquisição desses resultados foi *SkyScan1275* da marca *Bruker*.

2.6. Ensaios Mecânicos

Os ensaios mecânicos permitem obter o comportamento dos materiais quando sujeitos a esforços, que podem ser de tração, compressão, flexão, torção ou corte. Na investigação, os ensaios mecânicos constituem um meio relativamente simples de obter propriedades mecânicas importantes para comparação ou seleção de materiais [64].

Neste trabalho foram realizados ensaios compressão estáticos e dinâmicos no equipamento *Shimadzu MMT-101N*, ilustrado na figura 13, e os dados foram adquiridos através do software *Servo 4830*.

Os ensaios de compressão foram realizados através da aplicação de forças compressivas na amostra, obtendo-se assim curvas de deformação versus carga aplicada. Os ensaios de compressão foram realizados para três amostras de cada composição com uma velocidade de 0,5mm/min e força de 100 N.

Relativamente aos ensaios dinâmicos, estes consistiram na aplicação de em aplicar uma força perpendicular ao eixo do corpo, durante 10000 ciclos de deformação e relaxamento. Para estes ensaios foi utilizada uma frequência de 0.5 Hz e uma força de 100 N para uma percentagem de deformação de 10%.

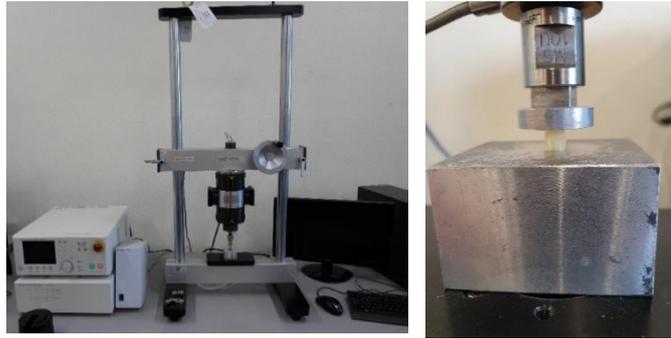


Figura 13 Equipamento *Shimadzu MMT-101N* com a amostra de EM em posição para realizar o teste mecânico.

3. Caracterização e purificação da matriz da EM

3.1. Purificação da matriz da EM

As amostras de EM foram primeiramente submetidas a uma análise de SEM, de modo a analisar a sua estrutura e grau de pureza. Na figura 14 está apresentada a imagem da amostra de EM sem lavagem, bem como o SEM das amostras purificadas com H₂O e HCl.

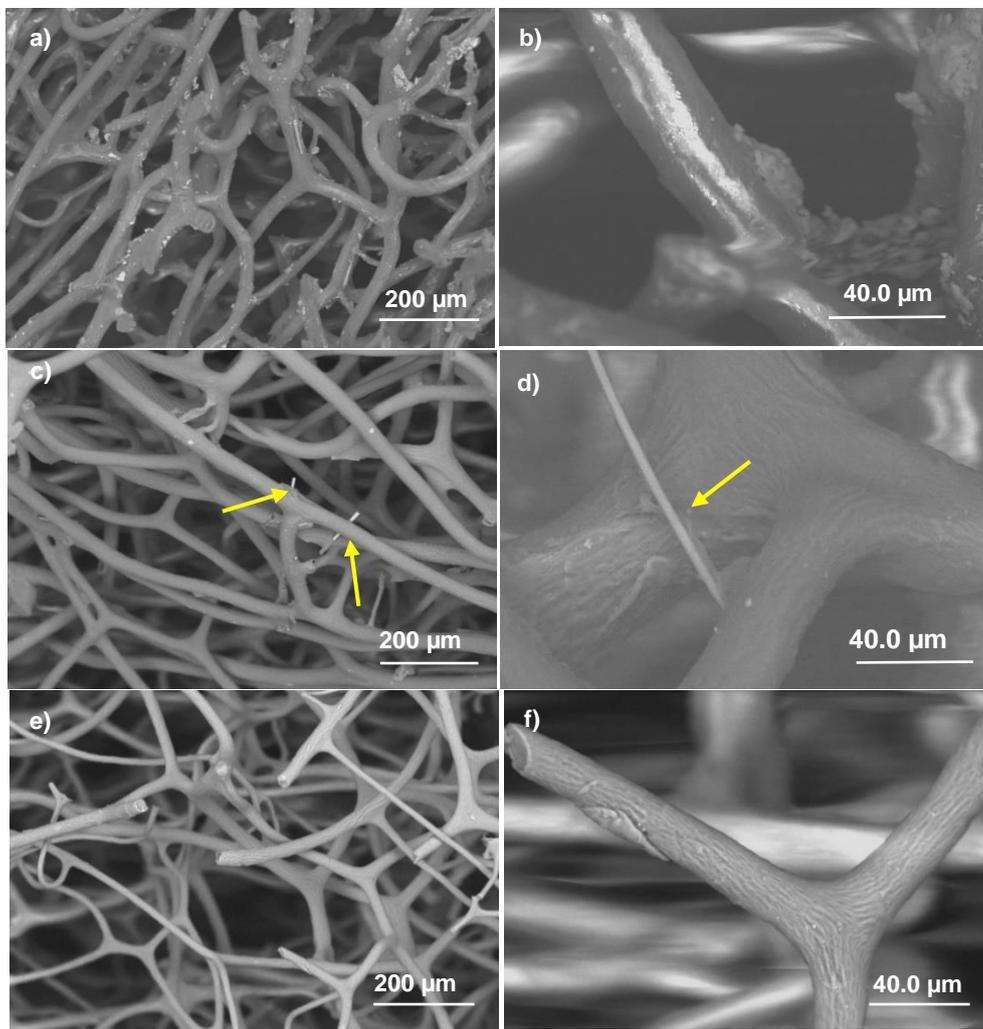


Figura 14 Imagens de SEM a diferentes ampliações da amostra de EM sem lavagem a) e b), EM_H₂O c) e d) e da EM_HCl e) e f).

A figura 14, a) e b), mostra que a EM sem lavagem apresenta quantidades relevantes de impurezas. As imagens de SEM obtidas para as amostras purificadas EM_H₂O e EM_HCl permitiu verificar uma redução significativa de contaminantes presentes na estrutura da esponjina (figura 14). No caso das amostras lavadas com água destilada são visíveis algumas espículas (indicado pelas setas). Nas amostras lavadas com HCl observou-se uma aparente eliminação de todos os contaminantes. De modo a identificar os elementos presentes nas amostras foi realizado um estudo de EDS, e os resultados obtidos através desta técnica estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 Massa normalizada dos elementos das amostras de EM, sem lavagem e lavadas com água destilada e HCl.

Massa Normalizada dos Elementos [%]						
Elementos	C	N	O	Ca	Si	outros
EM	46.16	10.68	33.26	4.91	0.92	4.07
EM_H ₂ O	48.79	13.52	34.75	1.04	0.21	1.69
EM_HCl	50.76	13.21	34.16	0.04	0.06	1.77

Através dos resultados por EDS foi possível confirmar que a matriz da EM estudada é composta principalmente de carbono, azoto e oxigénio. Além destes componentes, na matriz da EM, verificou-se a presença de alguns contaminantes na sua estrutura, maioritariamente cálcio e silício. Após a purificação com água destilada verificou-se uma redução significativa da presença de impurezas relativamente à amostra não lavada. Podendo, no entanto, observar-se ainda a presença de espículas de SiO₂ (figura 15). No caso das amostras EM_HCl verificou-se que as espículas de SiO₂ foram completamente removidas (figura 16).

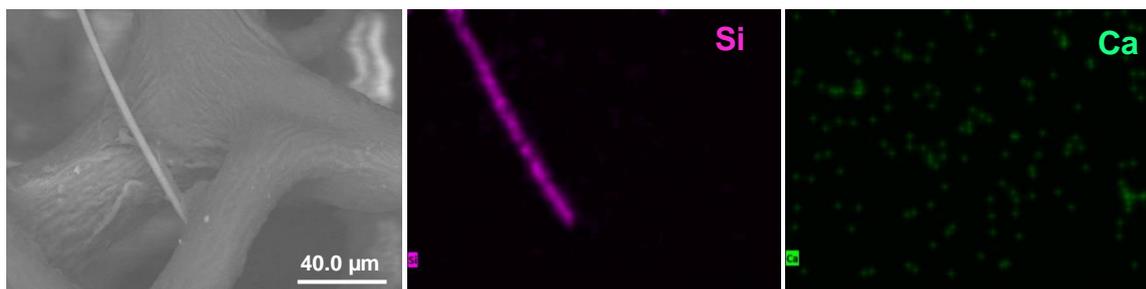


Figura 15 Micrografias de mapeamento do EDS com ampliação x2k da amostra EM_H₂O.

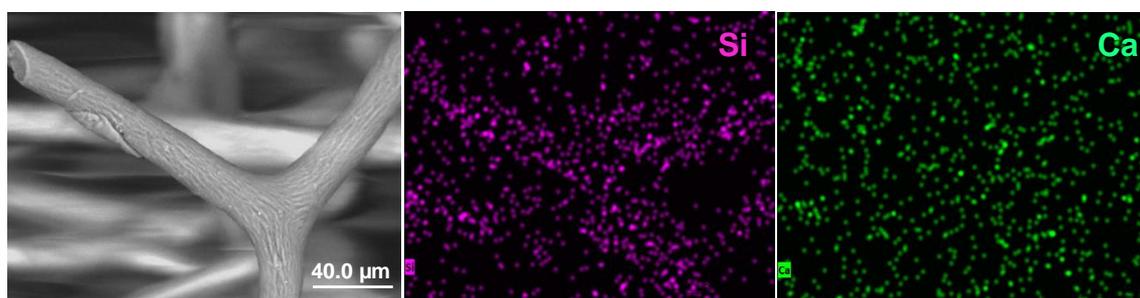


Figura 16 Micrografias de mapeamento do EDS com ampliação x2k da amostra EM_HCl.

De modo a analisar o grau de pureza das esponjas foram realizados análises de TGA às diferentes amostras preparadas e os seus resultados estão apresentados na figura 17. A análise termogravimétrica, permitiu avaliar a degradação das amostras e determinar o resíduo inorgânico final da mesma.

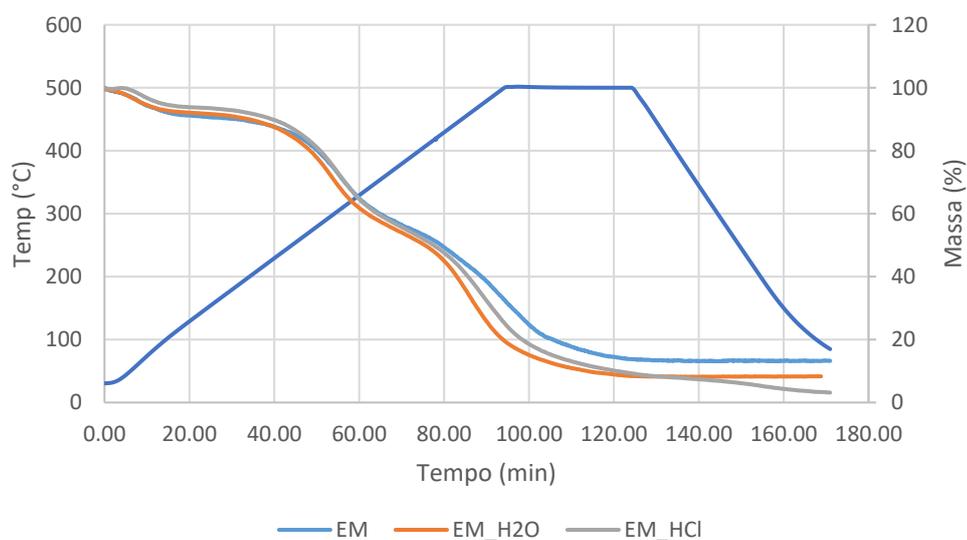


Figura 17 Gráfico de TGA das amostras EM, EM_H₂O e EM_HCl.

De um modo geral verificou-se que a degradação térmica das diferentes amostras de EM ocorrem em três estágios. É notório que as curvas são bastante semelhantes entre todas as amostras, destacando-se ligeiramente a amostra não lavada. A primeira perda de massa ocorre no intervalo entre os 35-231 °C e é atribuída essencialmente à evaporação das moléculas de água, com perdas na ordem de 10% [65]. Em relação ao segundo estágio, este corresponde ao intervalo entre 231-430°C e apresenta uma perda de massa considerável, de cerca de 41%, correspondente à destruição da estrutura proteica do esqueleto da esponja [47]. Quanto ao terceiro estágio, este ocorre para o intervalo de temperaturas 420-468°C, e apresenta uma perda de massa de 38% que está relacionada com a degradação da matéria orgânica da esponja [65]. As amostras apresentaram percentagens de resíduos inorgânicos diferentes, o que é indicativo dos diferentes graus de pureza. No caso da amostra da EM, o valor obtido foi 13.29%, a amostra EM_H₂O apresentou o valor de 6.61% e a amostra EM_HCl de 3.15%. Sendo que a amostra EM_HCl apresenta menor índice de resíduos inorgânicos significa assim que este tratamento é mais eficiente na purificação da EM.

A análise por FTIR das amostras foi realizada de modo a verificar se os tratamentos de purificação aplicados tiveram algum efeito na degradação da estrutura orgânica da matriz de esponjina (figura 18).

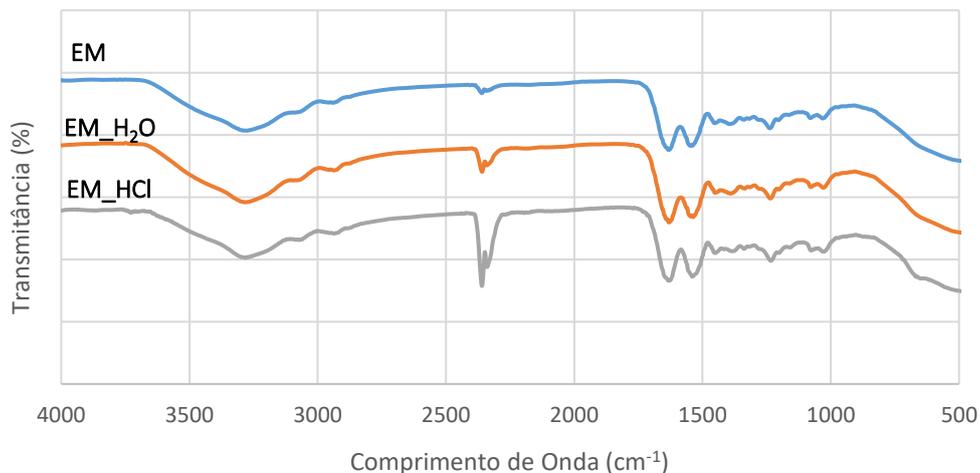


Figura 18 Gráfico de FTIR das amostras de EM, EM_H₂O e EM_HCl.

Ao observar a figura 18, verifica-se que o espectro da amostra de EM sem lavagem e o das amostras de EM lavadas são idênticos. Assim sendo, a lavagem com HCl, que mostrou ser a mais eficiente na eliminação dos resíduos inorgânicos, aparentemente não promoveu uma degradação da estrutura orgânica da EM. Os 3 espectros apresentam bandas com valores entre 2938 e 2940 cm^{-1} que correspondem a vibrações simétricas e assimétricas de CH_3 e CH_2 . Além dessas bandas, os espectros destas amostras apresentam, bandas a 1635 cm^{-1} que resultam das vibrações de alongamento de C-O. As vibrações de alongamento de C-O a 1230 cm^{-1} e a 1079 cm^{-1} podem ser atribuídas aos grupos funcionais, C-O-C e C-OH respectivamente [66]. As bandas a 3300 e 1540 cm^{-1} , indicam a presença de ligações N-H, e a banda a 1238 cm^{-1} indica a presença de ligações C-N, que estão relacionados com a estrutura dos aminoácidos que constituem a esponjina, presente no esqueleto das esponjas [65].

As amostras de EM purificadas, foram também submetidas a testes mecânicos em condições estáticas. Através destes testes foi possível obter os valores de módulo de Young. Este módulo é um parâmetro mecânico que proporciona uma medida da rigidez de um material sólido. É considerada uma propriedade intrínseca dos materiais, que depende da composição química e microestrutura, e pode ser obtida através da razão entre a tensão exercida e a deformação sofrida pelo material. Dependendo do valor do módulo de Young os materiais podem ser classificados como

rígidos ou flexíveis. Estes dois tipos de classificação flexibilidade traduzem de uma forma qualitativa o comportamento elástico dos materiais. Na figura seguinte estão apresentados os valores de módulo de Young obtidos para as diferentes amostras de EM.

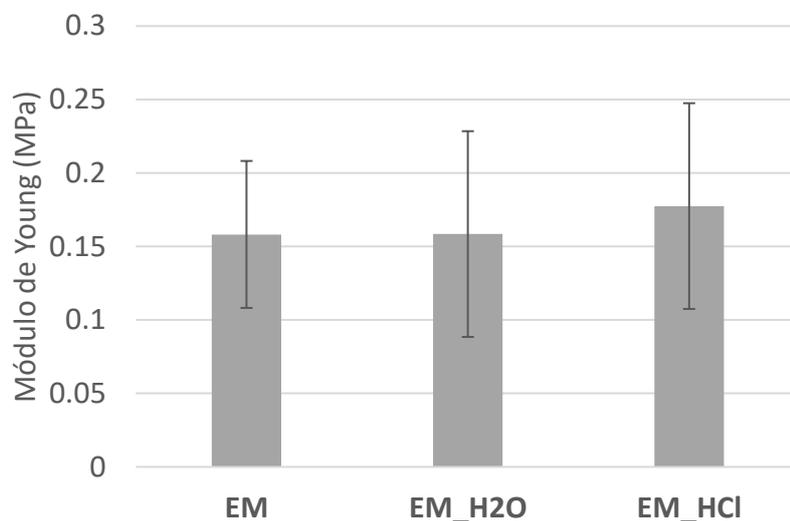


Figura 19 Gráfico do módulo de Young das amostras de EM.

Todas estas amostras apresentavam porosidade diferente e por esse motivo, os resultados dos testes mecânicos podem apresentar variabilidade entre as amostras com o mesmo tratamento.

A figura 19, mostra que os valores do módulo de Young são semelhantes entre todas as amostras. A EM apresenta um valor de 0,158 MPa, a EM_H₂O de 0,158 MPa e a EM_HCl de 0,177 MPa. Estes resultados são uma boa indicação de que a estrutura

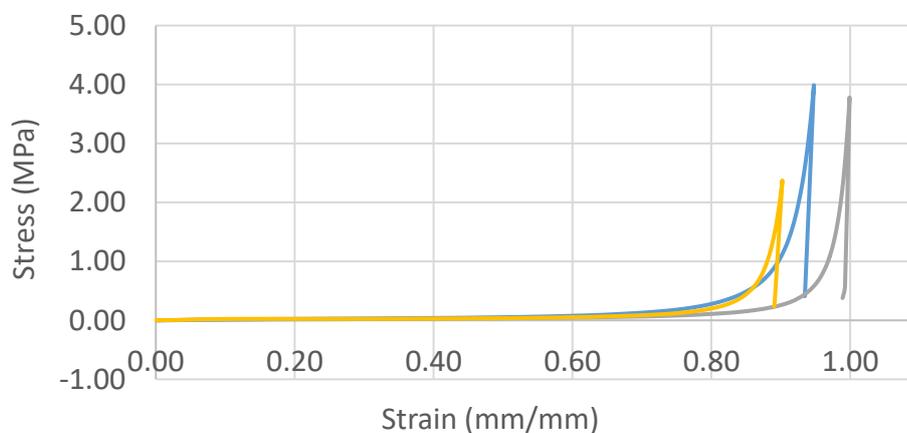


Figura 20 Gráfico da tensão-deformação das várias amostras de EM.

da EM com tratamento em meio ácido não foi danificada. Na figura 20 podem observar-se as curvas de tensão-deformação para as EM com e sem lavagem.

Os resultados representados neste gráfico mostram que quando a carga é aplicada, a deformação elástica permanece constante durante o período em que a carga é mantida constante. Após a remoção da carga, a deformação é totalmente recuperada, ou seja, a deformação imediatamente retorna ao valor zero. Ou seja, as amostras sem lavagem e as amostras lavadas apresentam um comportamento elástico. Em relação à amostra EM, esta apresenta um comportamento elástico desde o valor 0 ao 0.76 e apresenta um comportamento plástico do valor 0.76 até o final da curva. Relativamente à amostra EM_H₂O, do valor de deformação 0 ao 0.86 tem comportamento elástico e de 0.86 ao final da curva tem comportamento plástico. O comportamento elástico na amostra EM_HCl corresponde aos valores de deformação de 0 a 0.76 e o comportamento plástico de 0.76 a 0.81.

Os resultados obtidos quer pela caracterização química, térmica ou mecânica, indicam que as amostras EM_HCl apresentavam um maior grau de pureza e sem sinais evidentes de degradação quando comparadas com as amostras EM_H₂O. Nesse sentido este foi o protocolo experimental implementado durante os próximos estudos.

3.2. Tratamento térmico

As amostras foram tratadas termicamente (EM_TT) com o objetivo de avaliar a alteração das suas propriedades físico/químicas quando expostas a uma temperatura elevada (180°C), mas para a qual, ainda não ocorreu degradação como indicado no estudo termogravimétrico. Para analisar o efeito da temperatura na estrutura das (EM_TT) foi realizado um estudo comparativo por micro-CT, em que foi possível comparar os diâmetros das fibras das EM_TT com as amostras não tratadas (EM_HCl). Os resultados obtidos estão apresentados no gráfico da figura 21.

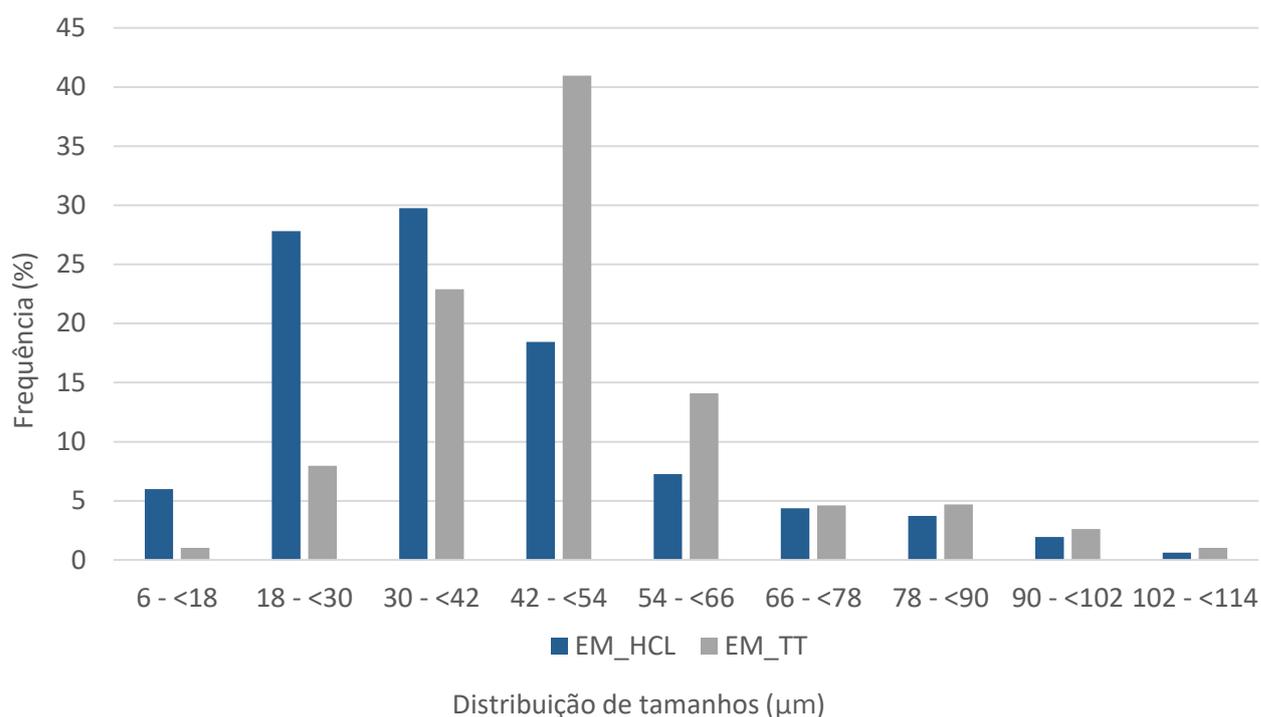


Figura 21 Gráfico do diâmetro das fibrilas das amostras EM_HCL e EM_TT.

Os resultados obtidos da figura 21 indicam um espessamento das fibrilas da EM após tratamento térmico, passando de um intervalo médio de diâmetro de 18-42 μm nas amostras não tratadas para um diâmetro médio de 42-66 μm. Estes resultados sugerem que este espessamento da estrutura das EM resulta de uma nova conformação das proteínas quando sujeitas a temperaturas elevadas (figura 21). Estes resultados eram de alguma forma esperados dado que com o aumento da temperatura verificou-se visualmente um decréscimo da porosidade da EM, ou seja, ocorreu densificação da amostra. Esta informação pode ser observada na figura 22, em que há uma mudança da tonalidade entre a amostra EM_HCL e a EM_TT, passando de amarelo para amarelo torrado.

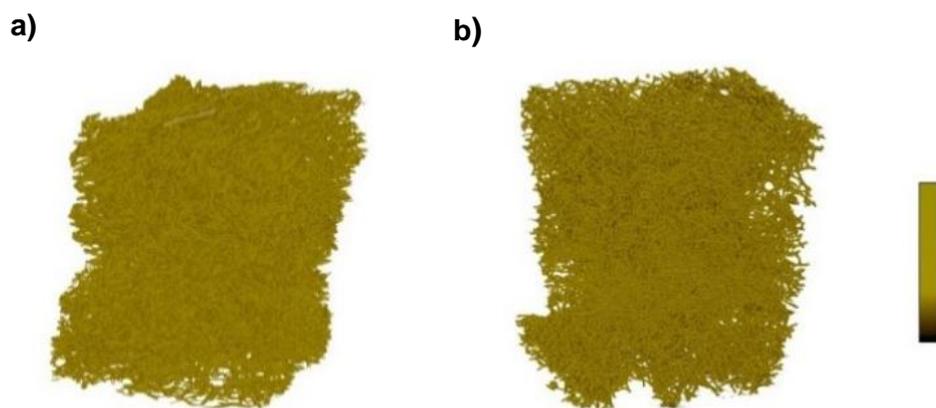


Figura 22 Imagens obtidas por micro-CT das amostras a) EM_HCl; b) EM_TT.

Através da análise de SEM (figura 23) é também possível confirmar que a EM_TT (a e b) apresenta os diâmetros das fibrilas com dimensões superiores aos das fibrilas das EM não tratadas termicamente (c e d).

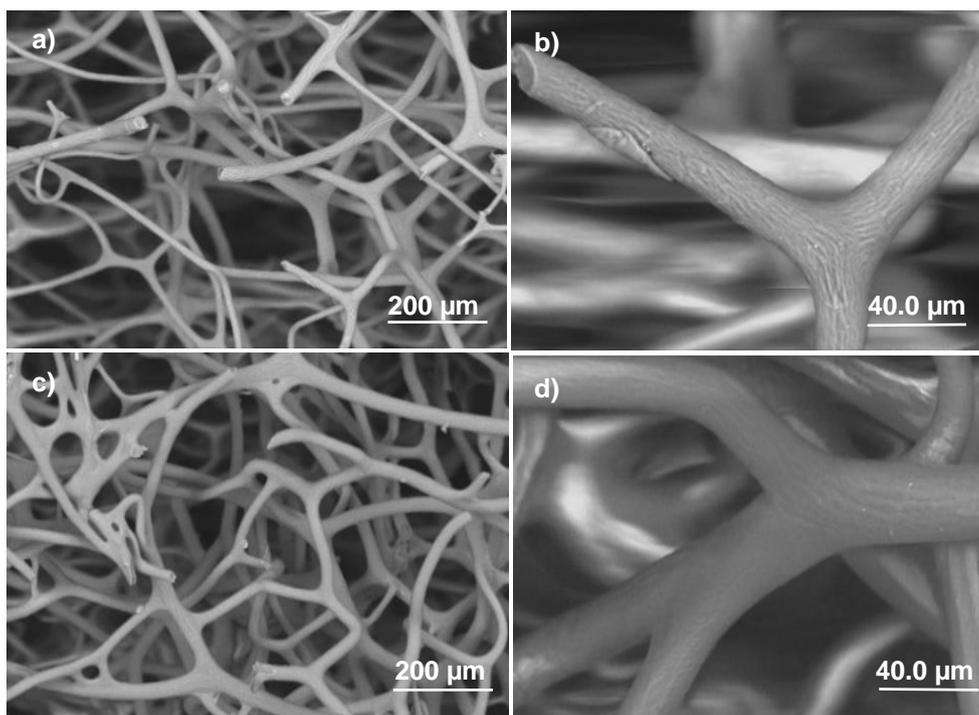


Figura 23 Imagens SEM das amostras: a) e b) EM_HCl; c) e d) EM_TT.

Além do aumento do diâmetro das fibrilas das EM após o tratamento térmico verificou-se também que a morfologia superficial das fibrilas foi alterada, apresentando uma menor rugosidade. A análise química das amostras foi obtida através de análises de FTIR, que se encontra representada na figura 24. Os resultados obtidos mostram

que a EM_TT apresenta um perfil do espectro semelhante ao obtido da amostra não tratada. Apresentando bandas a 1540 cm^{-1} , que exibem a presença de ligações N–H, e a 1635 cm^{-1} que resultam das vibrações de alongamento de C–O. As vibrações de alongamento de C–O são representadas no banda 1230 cm^{-1} (C–O–C) e em 1079 cm^{-1} (C–OH) [66]. As bandas a 3300 e 1540 cm^{-1} , indicam a presença de ligações N–H, e a banda a 1238 cm^{-1} indica a presença de ligações C–N. [65]. Desta forma pode-se concluir que o tratamento térmico não induziu danos significativos na estrutura química da amostra.

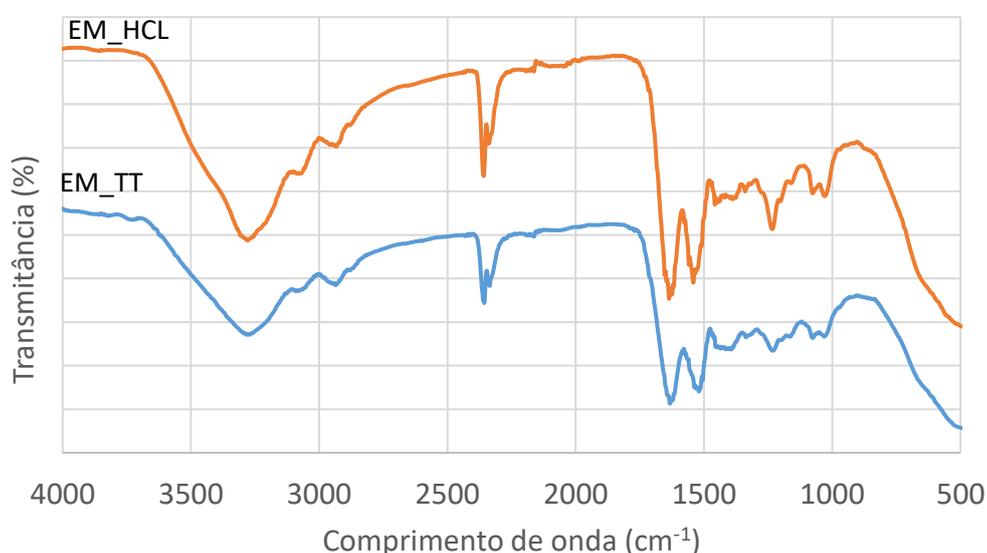


Figura 24 Gráfico do FTIR das amostras de EM_HCL e EM_TT.

A avaliação da estabilidade dimensional das amostras de EM_TT foi realizada através de testes mecânicos de compressão, sendo que os valores do módulo de Young estão apresentados na figura 25.

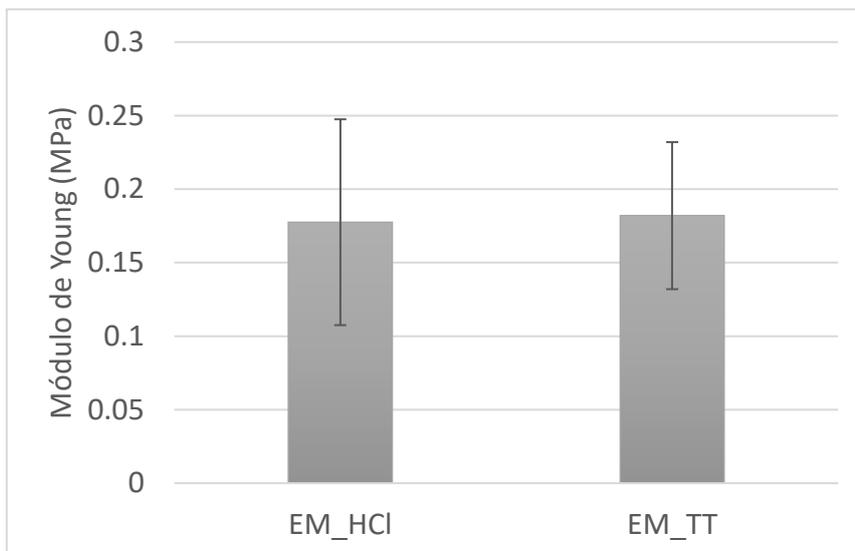


Figura 25 Gráfico do módulo de Young das amostras de EM_HCl e EM_TT.

Observando a figura 25, é notório que as amostras tratadas termicamente apresentam um módulo muito semelhante à amostra EM_HCl. Pois apesar de ambas as amostras apresentarem comportamentos diferentes, os resultados são uma média de várias amostras e a amostra testada pode ser mais ou menos porosa. Ainda assim, as EM_TT possuem um valor ligeiramente mais elevado, cerca de 0.4 MPa. Pois com aumento da temperatura as fibrilas das EM aumentam de diâmetro tornando as amostras mais densas e por esse motivo são mais rígidas, ou seja, são mais resistentes à deformação em relação às restantes amostras.

Os gráficos de tensão em função da deformação que está apresentado na figura 26, demonstram efetivamente que a EM_TT apresenta um comportamento mais plástico (deformação entre 0 e 0.67), ou seja, tem um menor comportamento elástico comparativamente às amostras de EM sem tratamento. Enquanto que amostra EM_TT colapsou a uma deformação de 0.67 a amostra EM_HCl continua a aumentar, ou seja, ainda está na parte elástica. Por esse motivo pode-se afirmar o colapso total da amostra ocorre para deformações menores.

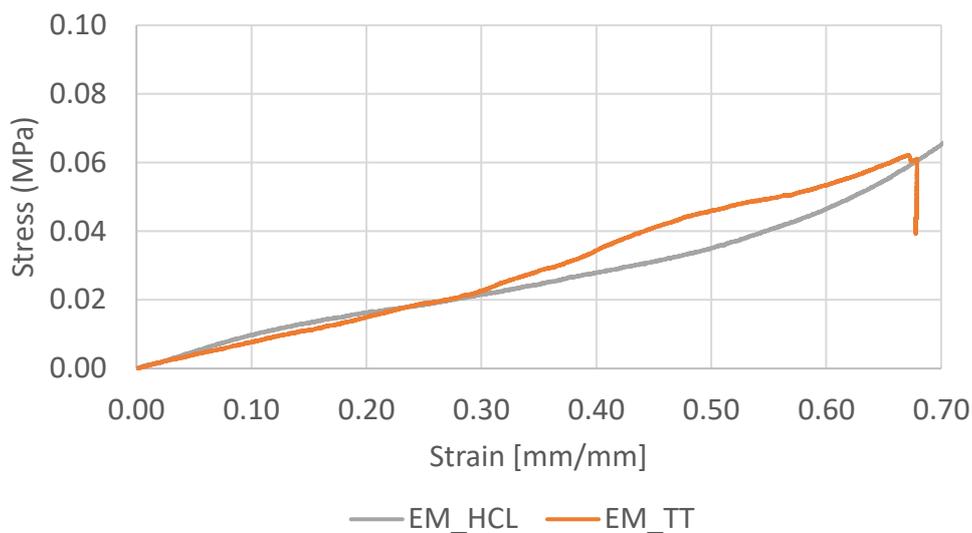


Figura 26 Gráfico da tensão-deformação da EM_HCl e da EM_TT.

3.3. Conclusão

Este capítulo permitiu concluir que o método mais eficaz para purificar as amostras de matriz da EM foi através do uso de uma solução de HCl 0.5 M comparativamente ao tratamento por agitação em água destilada. A diminuição da presença de contaminações na matriz de EM foi claramente observada por análise de SEM e EDS, quando comparativamente com as outras amostras. Além disso, estudos de TGA vieram corroborar estes resultados, pois a amostra purificada com HCl mostrou ter menor índice de resíduos inorgânicos (3.15%) comparativamente à amostra purificada com água destilada (6.61%). Os estudos mecânicos revelaram que as amostras EM_HCl preservaram a sua integridade estrutural mesmo após o tratamento ácido. O tratamento térmico de 180 °C/12h aplicado à matriz da EM, permitiu relevar que estas sofrem modificações estruturais irreversíveis.

CAPÍTULO IV

4. Crescimento controlado de fosfatos de cálcio na matriz da EM através de incubação em SBF e 10xSBF

De modo a induzir a formação de tecido ósseo de um material é frequentemente promover a formação de fosfatos de cálcio na sua superfície através da imersão em SBF. Fluido este, que apresenta concentrações de iões semelhantes às do plasma sanguíneo humano (tabela 6) [58]. Através desta abordagem foram explorados diversos parâmetros experimentais, tais como tempo de incubação, temperatura (37°C) e agitação para um recobrimento efetivo da superfície das EM agitação

Tabela 6 Concentrações iónicas do plasma humano e do SBF [62].

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ³⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	125,0	27,0	1,0	0,5

As soluções tradicionais de SBF exigem tempos de incubação prolongados, normalmente períodos superiores a 7 dias, para produzir um revestimento uniforme de fosfatos de cálcio. Assim sendo, a solução encontrada para reduzir o tempo necessário para a formação do revestimento consistiu no aumento significativo das concentrações iónicas. Neste caso, foi explorado comparativamente uma solução que continha concentrações iónicas 10 vezes superiores às das soluções tradicionais de SBF (10xSBF) [59].

4.1. Crescimento de fosfatos de cálcio por incubação em estufa

A modificação superficial das amostras da matriz da EM foram promovidas por incubação em solução de SBF ou 10xSBF. As amostras foram colocadas num recipiente de plástico fechado contendo a solução de SBF, que posteriormente foram colocados em estufa a 37°C. Nesta abordagem foi estudado o efeito do tempo de incubação tendo em conta as diferentes soluções de SBF usadas.

4.1.1. Incubação em SBF

As amostras de EM preparadas durante 7, 14 e 30 dias de incubação em SBF foram analisadas por SEM. Os resultados obtidos permitiram verificar uma evolução temporal do crescimento de fosfatos de cálcio à superfície das amostras (figura 27).

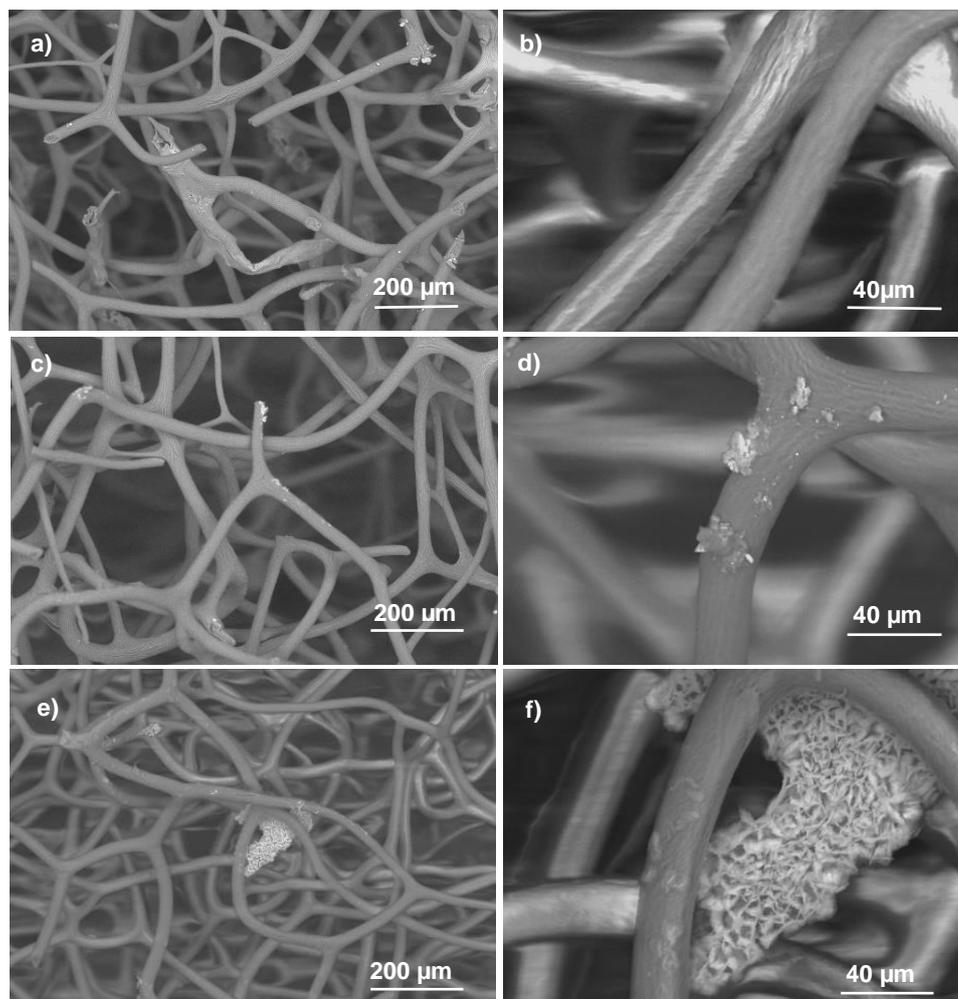


Figura 27 Imagens SEM das amostras de EM incubadas em SBF durante: a) e b) 7 dias; c) e d) 14 dias e e) e f) 30 dias.

As imagens de SEM que correspondem à incubação das amostras com a duração de 7 dias não apresentaram vestígios da formação de fosfatos de cálcio. Em relação às amostras que estiveram incubadas na estufa durante 14 dias ocorreu, embora em pequenas proporções, algum crescimento de fosfatos de cálcio. A observação da superfície da matriz da EM para incubação de 30 dias mostrou que apesar de existirem zonas das amostras que apresentavam fosfatos de cálcio, esse processo de crescimento não foi homogêneo. A análise de EDS às amostras preparadas para os diferentes tempos permitiram identificar os diferentes elementos químicos, que estão apresentados na seguinte tabela 7.

Tabela 7 Massa normalizada dos elementos presentes das amostras incubadas em SBF durante 7, 14 e 30 dias.

Massa Normalizada dos Elementos (%)						
Tempo de Incubação	C	N	O	Ca	P	outros
7 dias	51,18	11,78	36,07	0,33	0,00	0,64
14 dias	49,38	13,14	34,38	1,21	0,09	1,80
30 dias	47,13	12,84	34,27	1,31	0,16	1,77

Analisando os resultados obtidos por EDS, é notório que a deposição de fósforo foi nula ao fim de 7 dias e no período de 14 e 30 dias ocorreu alguma deposição de fósforo ainda que muito reduzida. No caso das amostras tratadas termicamente, incubadas com os mesmos períodos, verificou-se também apenas uma ligeira deposição de fosfatos de cálcio no período máximo de 30 dias (figura 28). Através da análise por EDS destas amostras não foi possível detetar a presença de fósforo e a quantidade de cálcio foi muito reduzida.

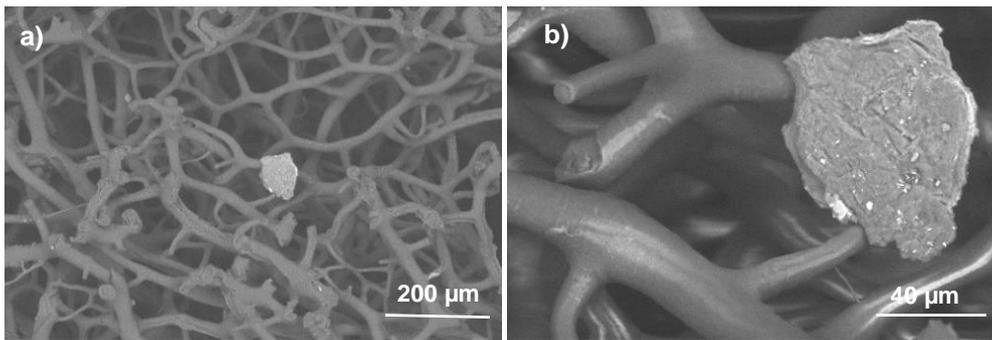


Figura 28 Imagens SEM das amostras tratadas termicamente incubadas em SBF durante 30 dias: a) ampliação 400; b) ampliação 2k.

4.1.2 Incubação em 10xSBF

As amostras de EM incubadas em 10xSBF foram investigadas quanto á evolução temporal (24h, 48h e 5 dias) do crescimento da camada apatítica (Figura 29).

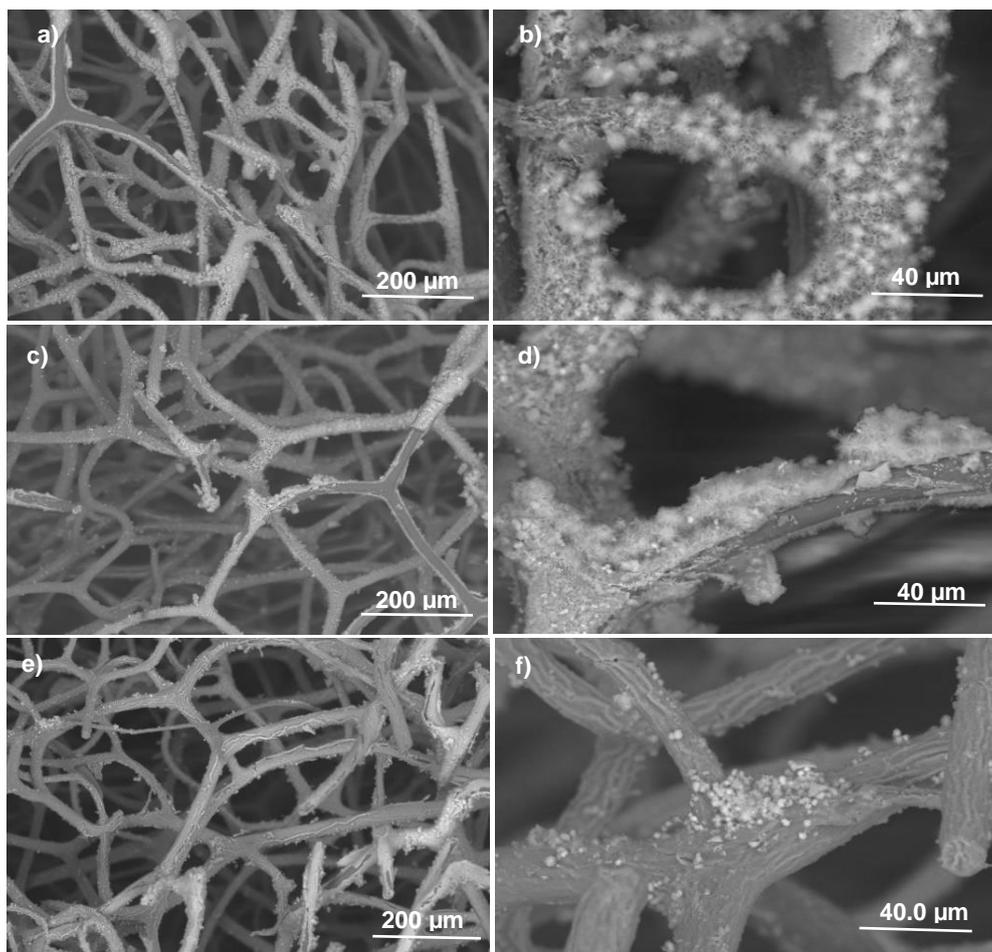


Figura 29 Imagens SEM das amostras EM_HCl imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.

Através da análise das imagens SEM dos vários períodos de incubação verificou-se alguma formação de fosfatos na parte exterior da EM, no entanto essa formação não foi igualmente observada no interior das amostras. No período de 24 horas, a amostra apresenta recobrimento de fosfatos de cálcio em praticamente toda a sua estrutura superficial, apesar de não ser completamente homogêneo. Em relação à amostra que esteve incubada durante 48 horas é possível observar pelas figuras que o recobrimento das fibras da EM é muito idêntico à amostra que esteve incubada 24 horas. Relativamente ao período de 5 dias, ocorreu um pequeno decréscimo da quantidade de fosfatos de cálcio. Na figura 30 apresenta-se as curvas das variações da percentagem atômica do cálcio e do fósforo, obtida através da análise por EDS, bem como o pH das soluções após a incubação para cada período estudado.

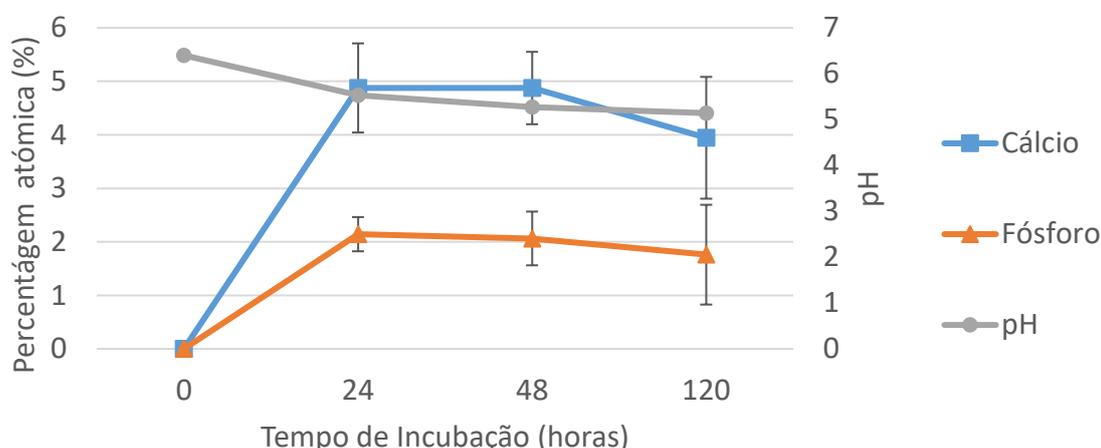


Figura 30 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras incubadas em 10xSBF e os valores de pH da solução após cada incubação.

Analisando os resultados do gráfico, verificou-se que o pH das soluções de 10xSBF ficou mais ácido ao longo do tempo de incubação. A análise por EDS corrobora os resultados das imagens de SEM, mostrando que as amostras imersas durante 24 e 48 horas foram as que apresentaram maior deposição de cálcio e fósforo. A relação Ca/P média de 2.26 para os períodos de 24, 48 e 120 horas, que pode ser atribuída à fase de fosfato de cálcio amorfo (ACP) [67].

As amostras modificadas foram analisadas por FTIR e os resultados obtidos estão representados no gráfico da figura 31. Através da análise por FTIR podem ser identificadas frequências aos modos vibracionais que representam o grupo PO_4^{3-} ,

nomeadamente em 550-600, 960,1020 cm^{-1} [68]. A presença de água absorvida também pode ser detetada na região de 3300-3500 cm^{-1} . Em todas as amostras é visível a presença de CO_3^{2-} no pico 1415 cm^{-1} . Estes resultados devem-se à presença do ião HCO_3^{2-} , o qual está presente no SBF e co precipita com os fosfatos de cálcio [69]. Em relação aos picos entre 2500 e 2000 cm^{-1} correspondem ao CO_2 atmosférico [69].

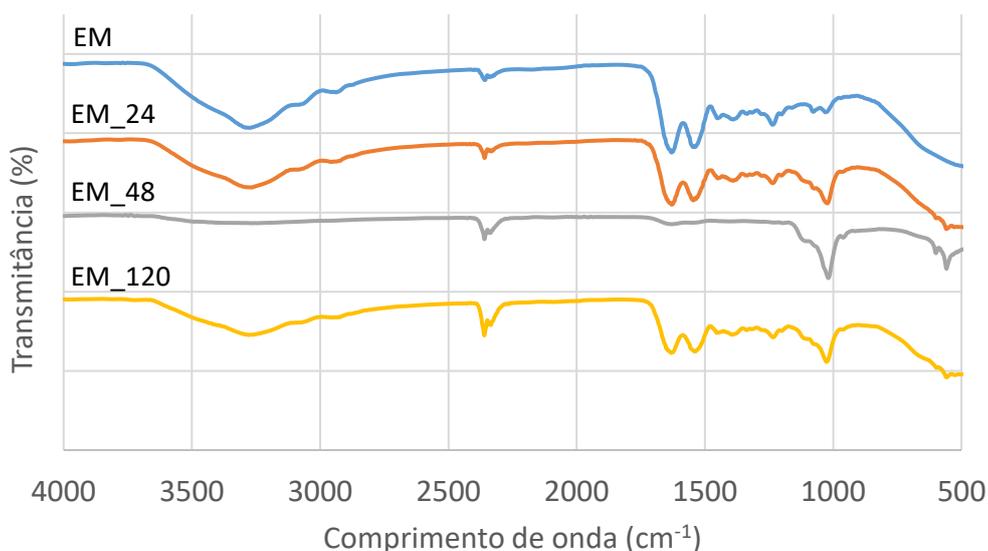


Figura 31 Gráfico do FTIR das amostras incubadas em 10xSBF durante 24 horas (EM_24), 48 horas (EM_48) e 5 dias (EM_120).

Os resultados obtidos demonstraram que a utilização da solução de 10xSBF comparativamente á solução de SBF, permitiu obter um recobrimento de fosfatos de cálcio mais efetivo e num menor período de tempo. Nesse sentido os testes seguintes para a modificação superficial das EM, foram conduzidos utilizando a solução de 10xSBF.

4.2. Crescimento de fosfatos de cálcio com agitação mecânica

De forma a promover o revestimento homogéneo no interior das amostras de EM, estas foram imersas em solução 10xSBF sob condições dinâmicas. Ou seja, as amostras foram colocadas em 20 mL da solução e ficaram em agitação durante os mesmos períodos referidos anteriormente [70].

4.2.1 Incubação em 10xSBF

A análise morfológica das amostras de EM que foram colocadas em agitação à temperatura ambiente está representada na figura 32.

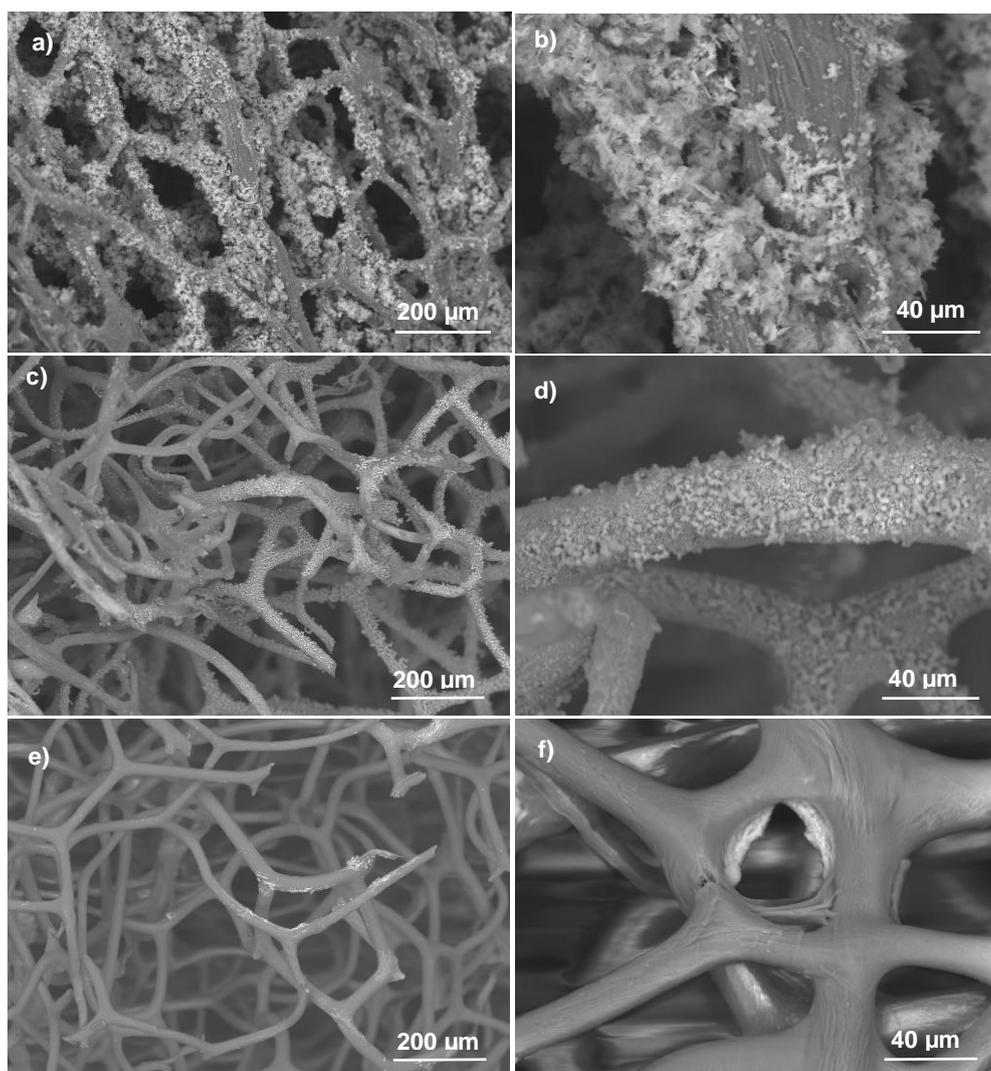


Figura 32 Imagens SEM das EM_HCl imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.

A análise por SEM mostrou que ao fim de 24 horas, a deposição de fosfatos de cálcio foi mais abundante que em relação aos restantes períodos de incubação. Observando a figura com maior ampliação (x400), verificou-se que os fosfatos de cálcio estão uniformemente distribuídos por toda a amostra incluindo no seu interior.

No entanto, foi também verificado que o recobrimento de fosfatos de cálcio nas fibras da EM não foi homogêneo. Estes resultados podem ser complementados com a análise figura 33.b obtida através do micro-CT. Através das imagens 3D obtidas, é possível comparar a amostra de EM (figura 33 a) com a amostra modificada em solução 10xSBF (figura 33 b). Os resultados obtidos permitem observar que após a incubação da EM durante 24h em agitação, houve uma deposição homogênea de fosfatos de cálcio em praticamente toda a superfície da amostra.

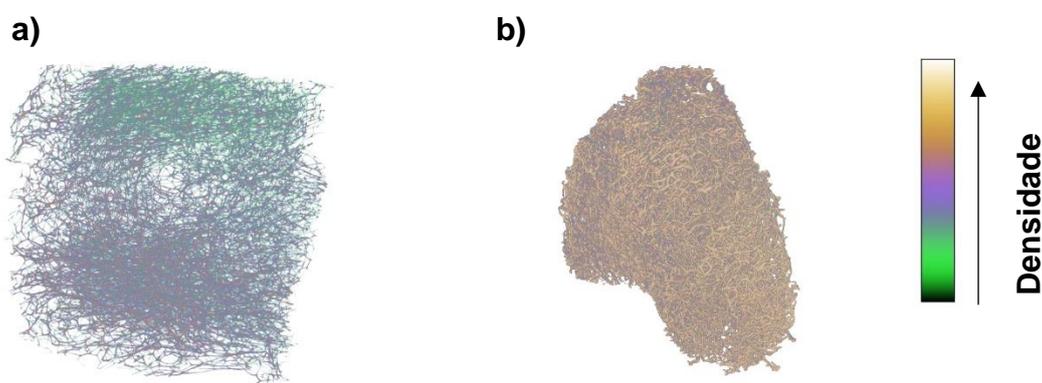


Figura 33 Imagens obtidas por micro-CT das amostras: a) EM_HCl e b) em agitação durante 24 horas em 10xSBF.

Em relação à amostra que esteve imersa durante 48 horas verifica-se que parte dos fosfatos de cálcio formados anteriormente na amostra foram removidos. Estes resultados sugerem que poderá ser uma consequência da amostra estar em agitação contínua, o que pode permitir um destacamento da camada de fosfatos de cálcio previamente formados na superfície da EM. Este efeito ainda foi mais evidente no caso da amostra de EM incubada durante 5 dias, onde se verificou que a amostra não continha qualquer evidencia de fosfatos de cálcio na sua superfície. A análise de EDS, permitiu investigar a variação da percentagem atômica do cálcio e do fosforo nas amostras em função do tempo de incubação (figura 34). Neste gráfico encontram-se também registados os valores de pH das soluções ao longo dos períodos definidos.

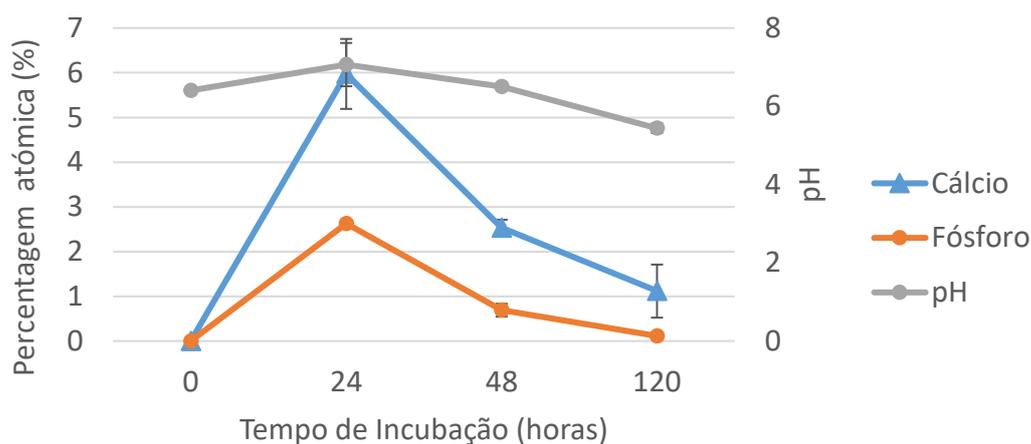


Figura 34 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras e os valores de Ph da solução após cada incubação.

Através dos resultados obtidos, verifica-se que ao fim de 24 horas o pH da solução aumentou e nesse período foi quando ocorreu maior deposição nas amostras de cálcio e fósforo, com a relação média de Ca/P de cerca de 2.27. Esta razão corresponde à fase de ACP [67]. Depois das 24 horas de incubação o pH da solução foi acidificando e a quantidade de cálcio e fósforo foi diminuindo ao longo do tempo.

As amostras de EM modificadas para cada período de incubação foram caracterizadas por FTIR, figura 35.

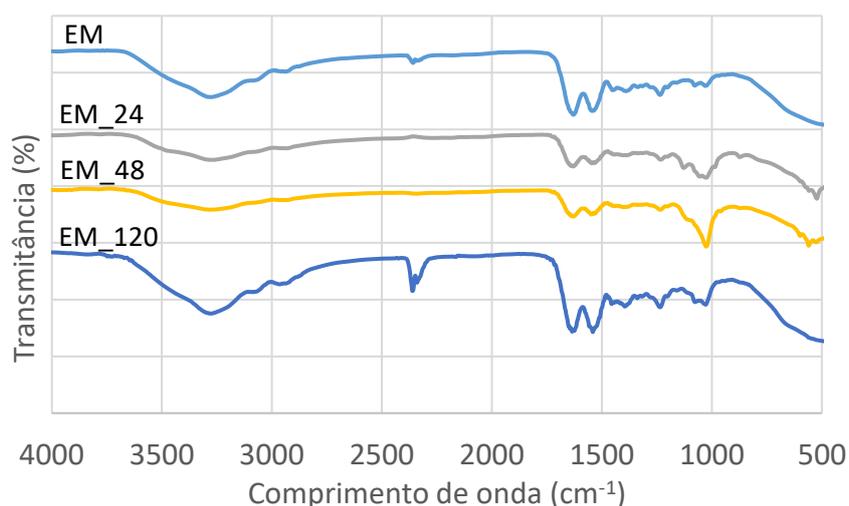


Figura 35 Gráfico do FTIR das amostras incubadas em 10xSBF durante 24 horas (EM_24), 48 horas (EM_48) e 5 dias (EM_120).

Ao analisar o gráfico da figura 35, verifica-se que os resultados desta técnica se complementam aos obtidos pelo SEM/EDS. Dado que as amostras imersas em solução durante 24 e 48 horas eram as que apresentavam maior recobrimento de fosfatos de cálcio, era previsível que isso fosse visível no gráfico do FTIR. Essas evidências podem ser identificadas claramente para as amostra de EM imersa durante 24 e 48 horas através da presença dos modos vibracionais característicos do grupo PO_4^{3-} em β – TCP nomeadamente a 550-600, 990 (em relação à amostra de 24 horas), 1020 a 1100 cm^{-1} [68][71].

As várias amostras preparadas foram caracterizadas por DRX. Os resultados evidenciaram que apenas a amostra que apresentava maior quantidade de fosfatos de cálcio, EM_24, foi possível identificar a fase cristalina presente. Estes resultados estão representados na figura 36. A análise dos resultados obtidos por DRX foi possível verificar que a amostra EM_24 apresenta um baixo grau de cristalinidade. No entanto, pode-se observar a existência de picos bem definidos que se identificam com os de β -TCP através da presença dos picos a 26.56°, 32.70° e 47.50° [72].

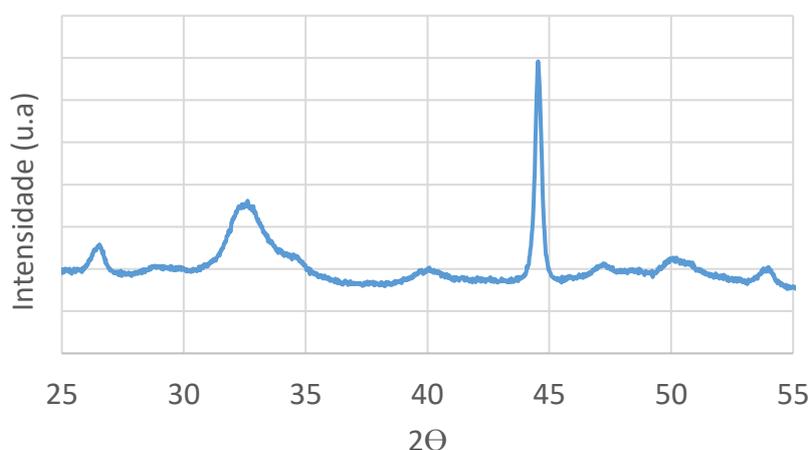


Figura 36 Gráfico do DRX das amostras incubadas e agitadas em 10xSBF durante 24 horas.

A eficiência da adesão do recobrimento dos fosfatos de cálcio à superfície da EM foi investigada através de testes dinâmicos de compressão. Nesse sentido, foram realizados testes dinâmicos em meio aquoso para verificar se os fosfatos de cálcio se mantinham na superfície da amostra EM_24 ou se com o número de ciclos de compressões poderia ocorrer uma lixiviação destes (Figura 37).

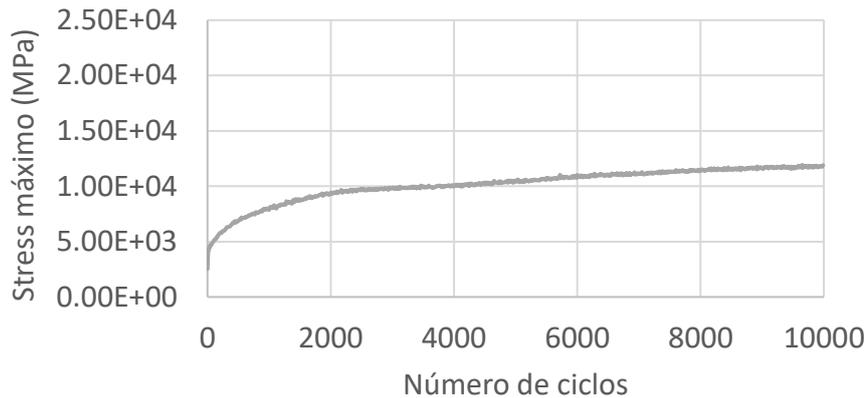


Figura 37 Gráfico do teste dinâmico da amostra incubada e agitada em 10xSBF durante 24 horas.

Observando o gráfico obtido pelo teste dinâmico, verificou-se que após um ajustamento inicial da amostra até aos 2000 ciclos, a curva obtida do stress máximo em função do número de ciclos apresentou valores constantes na ordem $1,0 \times 10^4$ MPa. Estes resultados revelaram que a amostra manteve a sua integridade estrutural ao longo dos 10000 ciclos de compressão, tal como verificado para as EM não modificadas. Após a realização deste teste, a amostra foi colocada na estufa para secar e posteriormente analisada por SEM.

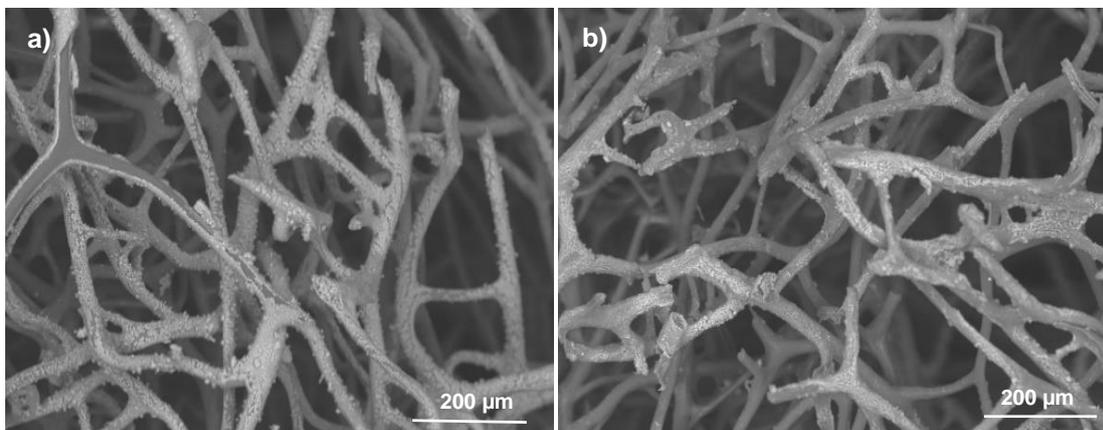


Figura 38 Imagens de SEM com ampliação de 400 da amostra imersa em 10xSBF durante 24 horas: a) antes do teste dinâmico; b) depois do teste dinâmico.

Comparando a amostra, antes e após ser sujeita ao teste dinâmico de compressão, é notório que ocorreu uma ligeira diminuição de fosfatos de cálcio. Assim, é possível afirmar que grande parte do recobrimento com os fosfatos de cálcio persiste aos diversos ciclos compressões em meio aquoso. Nesse sentido, é também

possível concluir da viabilidade de usar estes materiais em estudos de biocompatibilidade dinâmicos

4.3. Crescimento de fosfatos de cálcio com agitação mecânica e temperatura controlada

Neste estudo as amostras da matriz da EM foram incubadas em agitação e a temperatura controlada de 37°C (simulação da temperatura do corpo humano durante os mesmos períodos definidos anteriormente).

4.3.1 Incubação em 10xSBF

Na figura 39 estão representadas várias imagens das amostras que estiveram em banho de maria na solução 10xSBF para os períodos de 24, 48 e 120 horas.

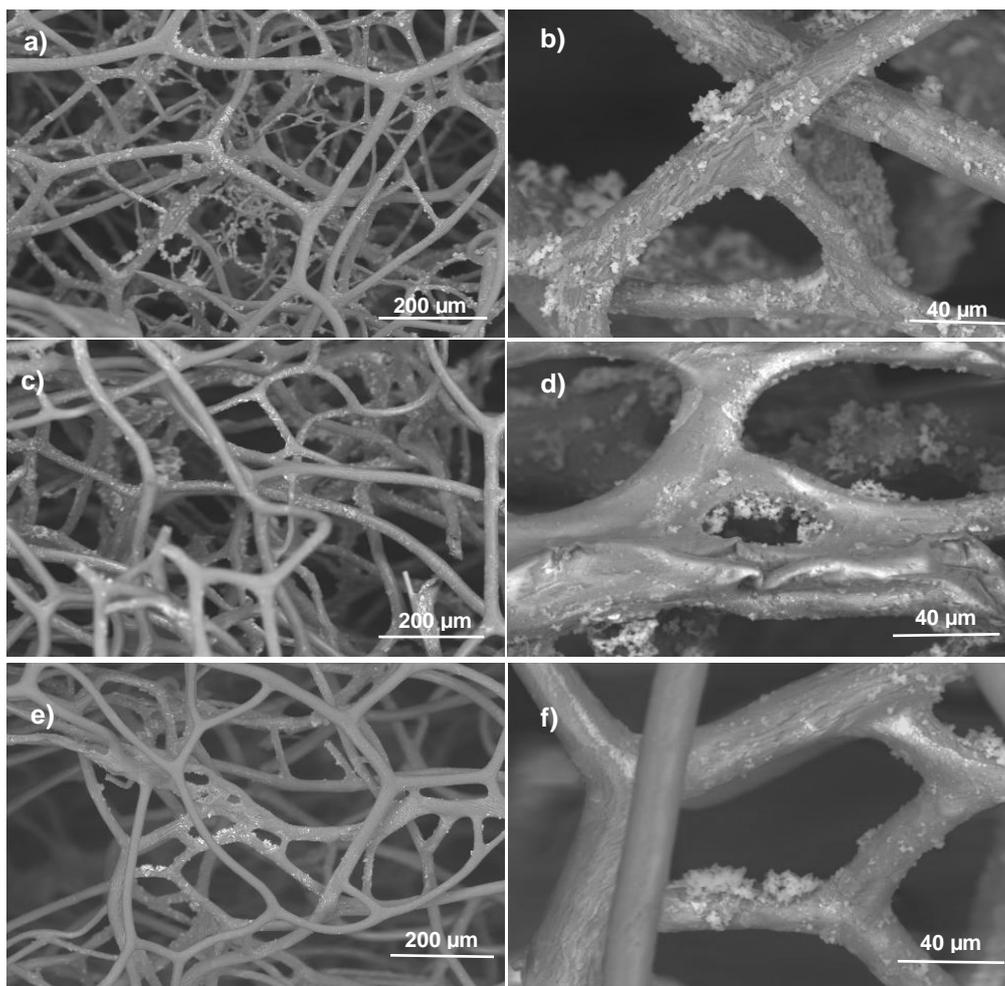


Figura 39 Imagens SEM das amostras EM_HCL imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.

Através das imagens obtidas por SEM foi possível verificar que a deposição de fosfatos de cálcio na superfície das amostras que estiveram imersas durante 24 e 48 horas foi semelhante. Observou-se ainda que as fibras que se encontram mais no interior das amostras apresentavam mais fosfatos de cálcio. No entanto, essa quantidade foi inferior à formada nas amostras que estiveram em agitação em temperatura ambiente. A amostra que esteve durante 120 horas em banho maria, apresentou um resultado idêntico à amostra que esteve em agitação durante o mesmo tempo à temperatura ambiente, ou seja, os fosfatos de cálcio que se tinham depositado anteriormente foram destacados da superfície da EM. Isto aconteceu provavelmente pela solução estar em agitação, o que pode permitir uma dissolução quando o período de agitação é muito grande.

Após a análise morfológica, as amostras foram analisadas através do EDS, que permitiu quantificar a deposição de cálcio e fósforo. Estes resultados estão representados na figura 40.

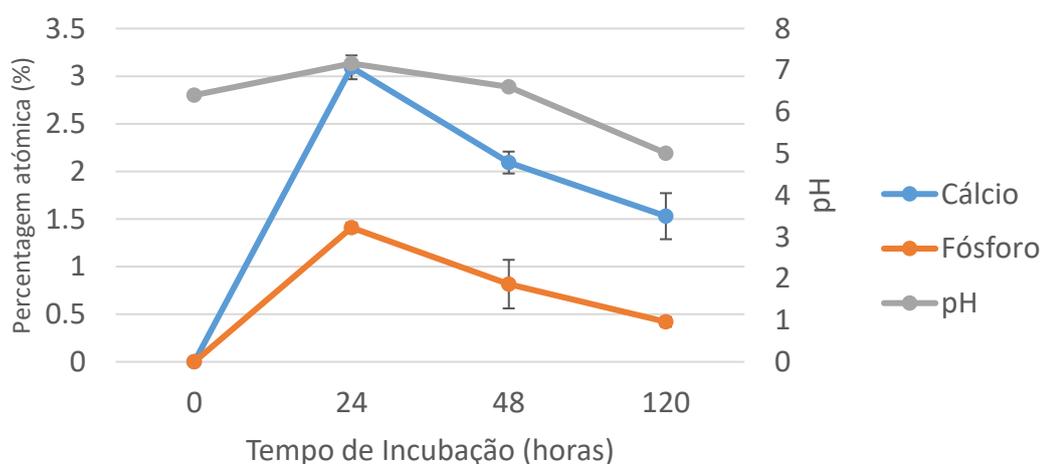


Figura 40 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras e os valores de pH da solução após cada incubação.

Com os resultados obtidos por EDS pode-se observar que ao fim de 24 horas de incubação ocorreu o pico de deposição de fosfatos de cálcio na superfície da amostra, com o quociente de Ca/P de 2.19, correspondendo à fase ACP [67]. Este aumento da deposição de cálcio e fósforo coincidiu com o aumento do pH da solução. Depois do período de 24 horas, o valor do pH foi diminuindo e a quantidade de cálcio

e fósforo na amostra também, chegando quase a ser inexistente a presença de fósforo na amostra ao fim de 5 dias.

As amostras que estiveram incubadas 24 e 48 horas foram também analisadas por FTIR, figura 41. Os resultados obtidos permitiu verificar o aparecimento de novas bandas do espectro das amostras imersas. Através dessas bandas podem ser identificadas frequências através dos modos vibracionais característicos do grupo PO_4^{3-} em β -TCP, nomeadamente em 550-600 e 1020 a 1100 cm^{-1} [71][71].

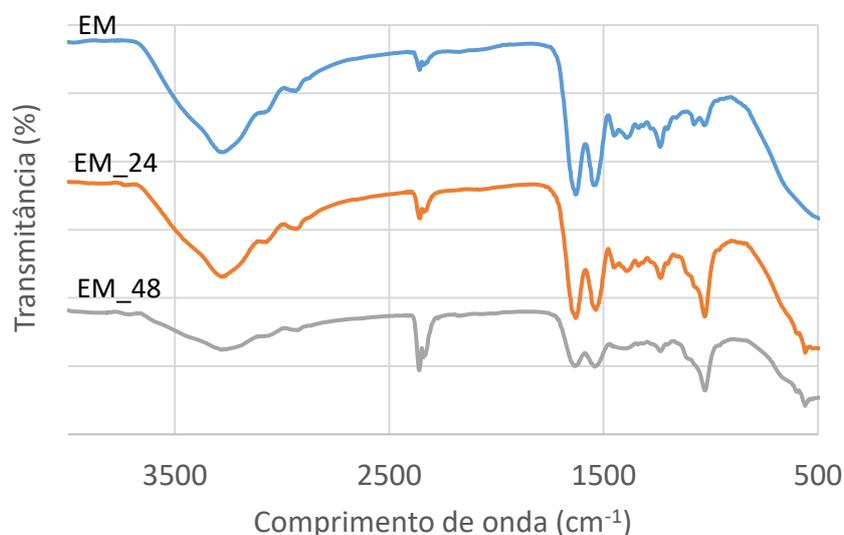


Figura 41 Gráfico do FTIR das amostras incubadas em 10xSBF durante 24 horas (EM_24) e 48 horas (EM_48).

4.4. Conclusão

Este capítulo permitiu verificar que o crescimento de fosfatos de cálcio por solução SBF na superfície das amostras de EM, através da incubação em estufa a 37°C é uma abordagem viável. No entanto, a incubação da EM em solução 10xSBF permitiu que ocorresse a formação e deposição, de quantidades ligeiramente mais elevadas e de modo mais uniforme de fosfatos de cálcio na superfície das amostras.

Sabendo que o uso da solução 10xSBF se revelou uma solução mais eficaz, foram testadas diferentes abordagens de incubação para as amostras, tais como a incubação das amostras na estufa a 37°C, em agitação à temperatura ambiente e em agitação a 37°C. As amostras incubadas na estufa, apresentavam uma quantidade de

cálcio e fósforo muito idêntica nos 3 intervalos de tempo analisados. Em relação às amostras que estiveram em agitação, verificou-se que no período de 24 horas foi quando ocorreu maior deposição de fosfatos de cálcio nas amostras, em comparação com os valores dos restantes períodos de análise e também comparativamente aos resultados obtidos em estufa. No entanto, ao fim de 5 dias a quantidade de cálcio e fósforo diminuiu significativamente. Relativamente às amostras que estiveram em agitação a 37°C apresentaram resultados semelhantes às amostras que estiveram a agitar a temperatura ambiente, o que mostra que a temperatura de 37°C não teve influência significativa nos resultados obtidos.

Assim sendo, pode-se concluir pelos resultados obtidos que o método da agitação à temperatura ambiente por um período de 24 horas apresentou melhores resultados em termos de recobrimento uniforme da superfície das EM com fosfatos de cálcio. Neste contexto, este foi o protocolo experimental adotado nos estudos seguintes.

5. Crescimento de fosfatos de cálcio com modificação superficial da matriz da EM

Neste capítulo a superfície da matriz da EM foi previamente modificada através do uso de diferentes agentes de nucleação, incluindo polieletrólitos, polímeros naturais e corantes. A utilização de polieletrólitos, aniônicos e catiónicos, para a formação de multicamadas sequenciais em substratos sólidos constitui uma forma original e simples de preparação de superfícies finas funcionalizadas [73]. Essas multicamadas têm potencial para serem usadas como reservatório de íons. Ou seja, os íons de cálcio e fósforo podem ser aprisionados dentro dos filmes formados e induzir a precipitação de fosfato de cálcio sobre as multicamadas [74].

Os polímeros naturais apresentam características como biocompatibilidade, comportamento bioativo e versatilidade química. Sendo essas as suas características, estes foram utilizados no revestimento da matriz da EM para incrementar a adesão dos fosfatos de cálcio e promovem crescimento de fosfatos de cálcio.

Na modificação superficial da matriz da EM foram também utilizados corantes como agentes de nucleação. Sendo que as EM conseguem acumular elevadas quantidades de corantes e outros poluentes [75], estes foram testados quanto à sua capacidade de indução do crescimento de fosfatos de cálcio nas EM.

5.1. EM modificadas com Polieletrólitos

Os polieletrólitos utilizados para recobrir as amostras de EM com multicamadas foram o PEI e o PSS. O processo de deposição das multicamadas é atribuído às interações eletrostáticas entre os polieletrólitos de cargas opostas [74]. A amostra de EM foi primeiramente recoberta com o polieletrólito positivo PEI que tem carga positiva. Posteriormente foi recoberta com PSS, que apresenta carga negativa. Sendo esta camada, a última depositada na amostra, permite que haja atração para catiões como é o caso do Ca^{2+} facilitando a nucleação e crescimento dos fosfatos de cálcio.

Na figura seguinte estão apresentadas as imagens adquiridas pelo SEM das amostras incubadas 24 e 48 horas e 5 dias em 10xSBF.

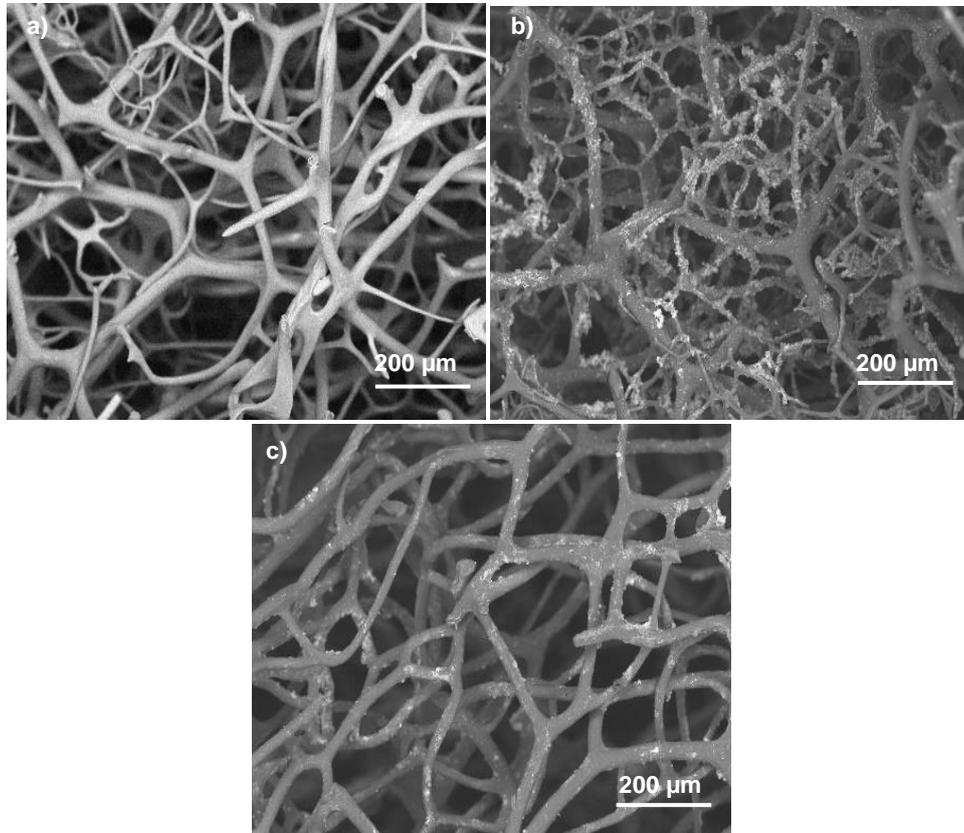


Figura 42 Imagens SEM das amostras revestidas por PEI+PSS imersas em 10xSBF durante: a) 24 horas; b) 48 horas e c) 5 dias.

Ao observar as imagens de SEM verifica-se que ao fim de 24 horas de imersão da amostra na solução, não ocorreu praticamente nenhuma deposição de cálcio e fósforo na amostra. No período de 48 horas ocorreu alguma deposição de fosfatos de cálcio nas fibras da EM, no entanto a deposição não foi homogênea. Em relação ao período de 5 dias é visível que houve um decréscimo na deposição de fosfatos de cálcio. Análise de EDS das amostras, permitiu obter as percentagens atômicas do cálcio e fósforo que estão apresentadas no gráfico da figura 43.

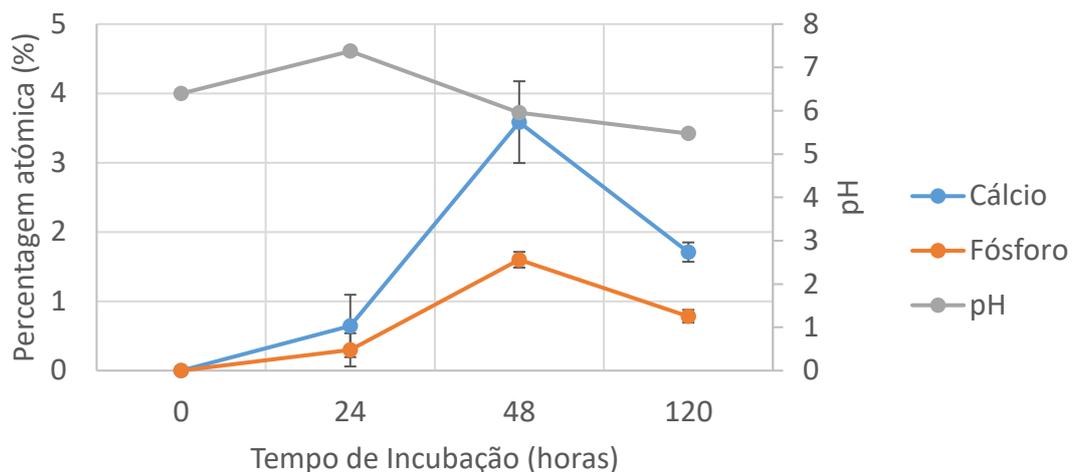


Figura 43 Evolução das porcentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras e dos valores de pH da solução após cada incubação.

Analisando os resultados do gráfico, o pH da solução sofreu um ligeiro aumento ao fim de 24 horas com a amostra imersa e depois foi acidificando ao longo do tempo. Em relação aos valores da razão de Ca/P, no período de 24 horas foi de 2.16, no período de 48 horas foi de 2.24 e ao fim de 5 dias a amostra apresentou a razão com o valor de 2.19. Esta razão ocasionou o aparecimento da fase ACP [67].

5.2. EM modificada com biopolímeros

As amostras de EM foram recobertas com polímeros de origem natural, alginato e quitosano, com o intuito de promover mais eficiente adesão dos fosfatos de cálcio nas superfícies das fibras da EM. O alginato é um polímero aniônico, que apresenta biocompatibilidade e baixa toxicidade. Este polímero por ter carga negativa permite que os íons de cálcio sejam atraídos, facilitando a posterior deposição de fósforo na amostra [76]. Em relação ao quitosano, este é um polissacarídeo linear policatiônico, derivado da quitina. O quitosano é insolúvel em água e solúvel em condições ácidas. É reconhecido como um biomaterial versátil devido à sua não toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. A sua natureza catiônica é bastante especial, já que a maioria dos polissacarídeos são geralmente neutros ou carregados negativamente em ambiente ácido. Esta propriedade permite formar complexos eletrostáticos ou estruturas multicamadas com outros polímeros sintéticos ou naturais

carregados negativamente. Dada essa característica permite que os íons de fósforo, que têm carga negativa, sejam atraídos [77].

Após as amostras serem recobertas com os polímeros naturais, estas foram imersas em solução 10xSBF e colocadas em agitação durante 24 horas de forma a testar a eficácia destes polímeros na deposição de fosfatos de cálcio na sua superfície. Na figura 44 estão apresentadas as imagens obtidas por SEM após as amostras serem revestidas por alginato e quitosano.

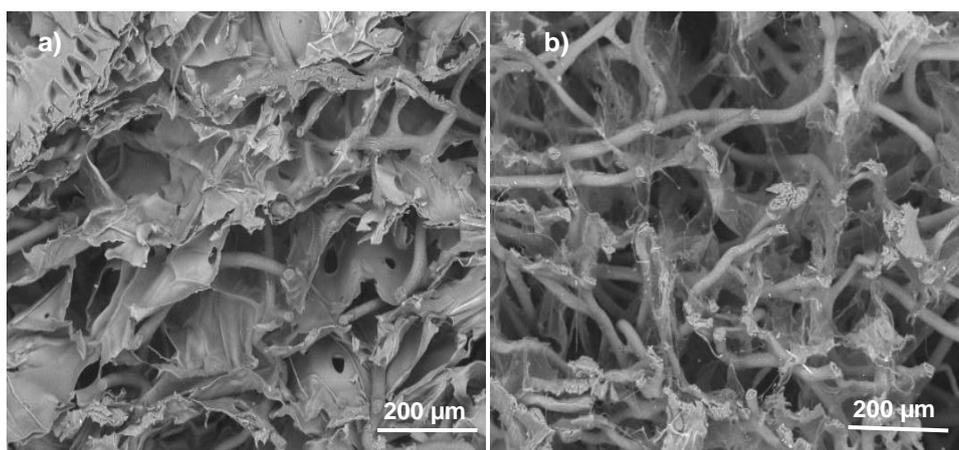


Figura 44 Imagens SEM das amostras revestidas de: a) alginato; b) quitosano.

As imagens obtidas por SEM permitiram verificar que tanto a amostra revestida por alginato como a amostra revestida por quitosano apresentaram o polímero uniformemente distribuído pela matriz. No caso da amostra revestida por alginato, o polímero parece ter uma espessura fina e opaca, reduzindo a visualização das fibras da matriz da EM. Em relação à amostra revestida por quitosano, esta apresenta uma espessura muito fina, podendo ser comparado a uma teia de aranha.

5.2.1 EM modificada com alginato

A análise morfológica das amostras de EM revestidas por alginato após serem imersas em 10xSBF está apresentada na figura 45.

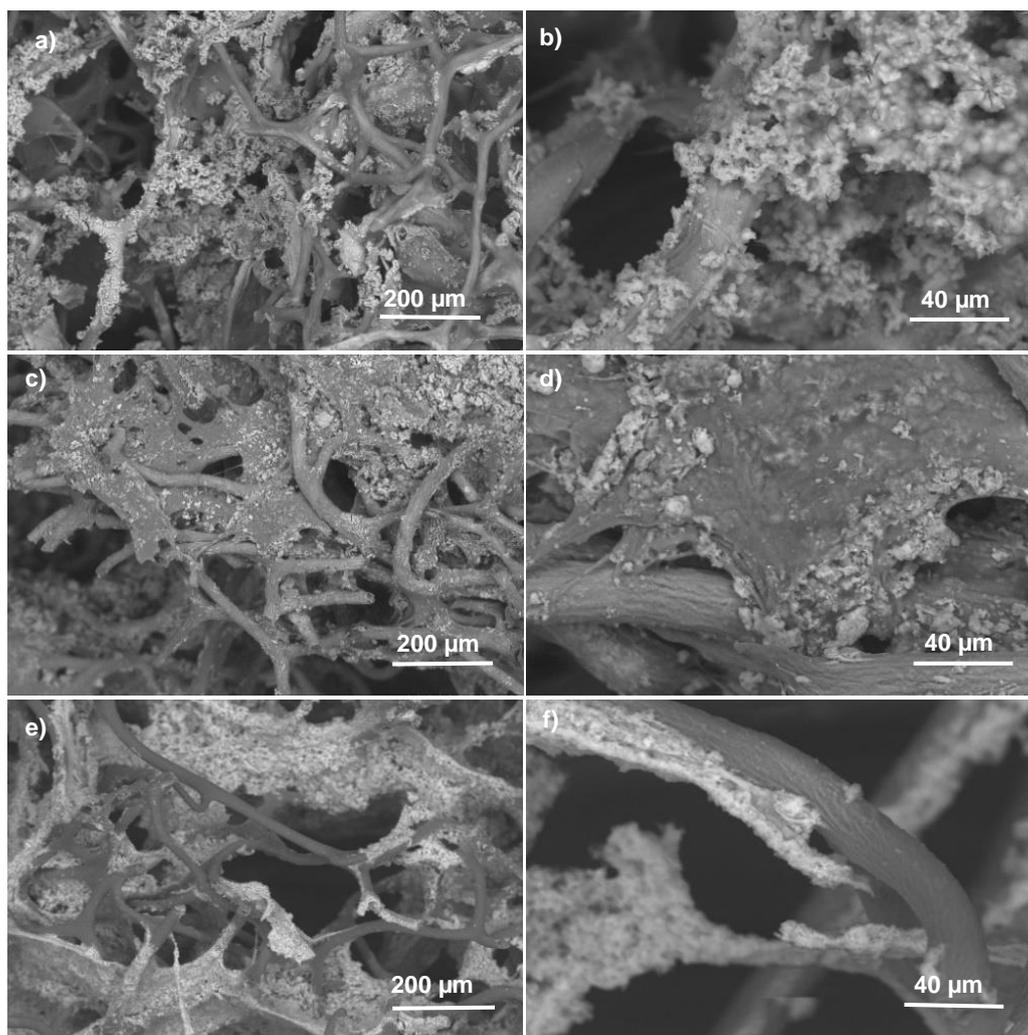


Figura 45 Imagens SEM das amostras modificada com alginato imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.

Pela observação das imagens de SEM é notório que ocorreu maior deposição de fosfatos de cálcio nos períodos de incubação de 24 horas e 5 dias. Seria esperado que tal como as amostras sem tratamento, colocadas em agitação, a deposição de fosfatos de cálcio fosse maior ao fim de 24 horas. No entanto, e complementado as imagens SEM com as adquiridas por EDS (figura 46), os resultados mostram que as fibras das EM, que são constituídas principalmente por carbono, não apresentam praticamente fósforo nem cálcio e estes elementos se depositaram principalmente nas zonas da amostra que têm o polímero. Para além disso, contrariamente às amostras depositadas diretamente na EM, os fosfatos de cálcio depositados na superfície do polímero mantêm-se bastante fixos mesmo durante 5 dias em agitação.

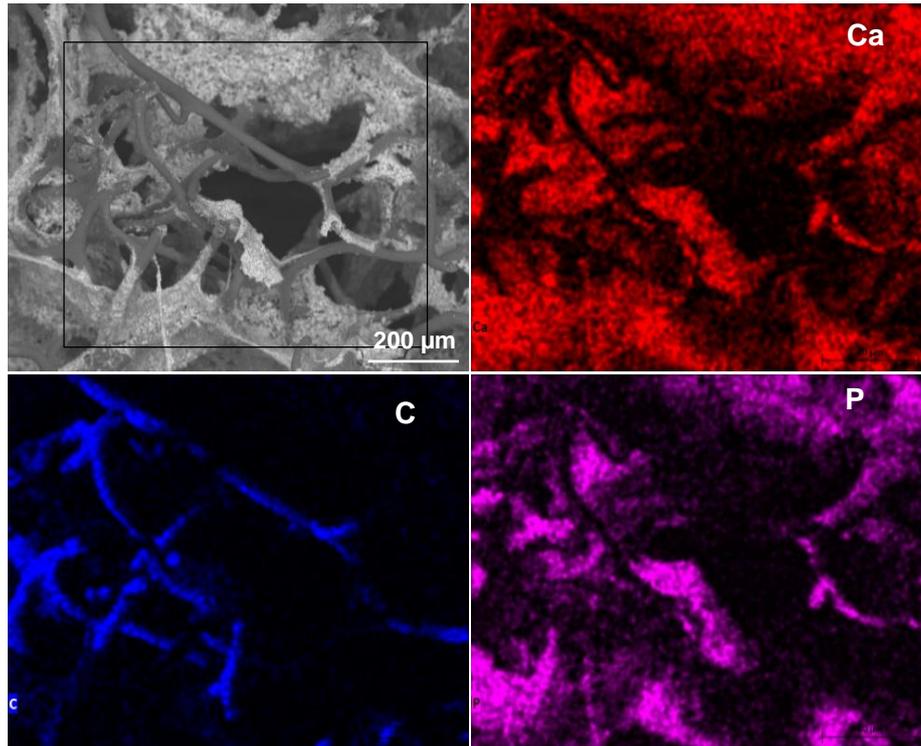


Figura 46 Mapeamento da amostra modificada com alginato obtida por EDS.

Através da análise de EDS, obteve-se os valores da percentagem atômica dos elementos presentes na amostra que estão presentes na figura 47.

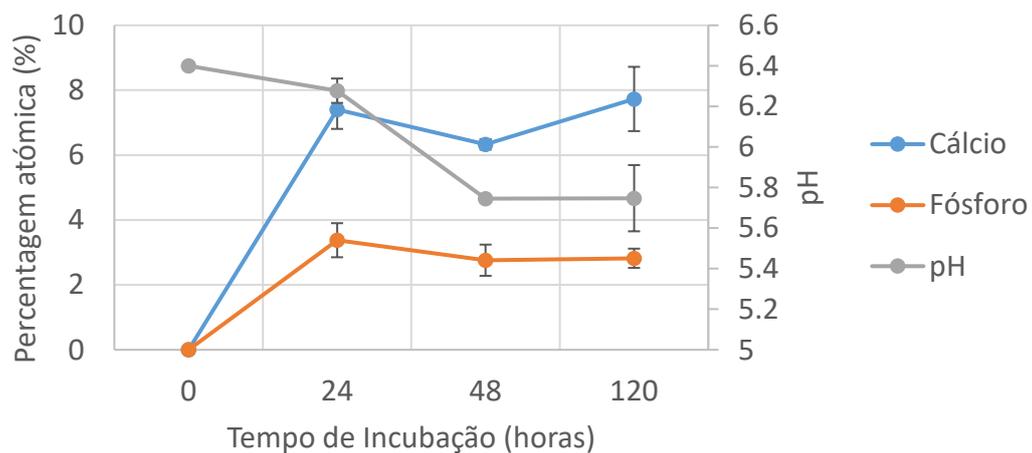


Figura 47 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras modificada com alginato e dos valores de pH da solução após cada incubação.

Através destes valores é possível calcular o rácio dos fosfatos de cálcio, que foi de 2.19 para o período de incubação de 24 horas e 2.29 no período de incubação de 48 horas. No período de 5 dias ocorreu um aumento significativo de cálcio em comparação com os restantes períodos de incubação, porém o fósforo não aumentou na mesma proporção sendo o rácio neste período de cerca de 2.76. Estes valores da razão Ca/P correspondem à fase ACP [67]. Analisando a deposição de fosfatos de cálcio e o pH da solução não é possível justificar a relação entre o valor de pH e a formação de fosfatos de cálcio. Dado que com o pH mais elevado, no período de 24 horas, a quantidade de cálcio e fósforo é semelhante quando o pH é mais baixo, no período de 5 dias. As amostras foram também analisadas por FTIR e os resultados obtidos encontram-se na figura seguinte.

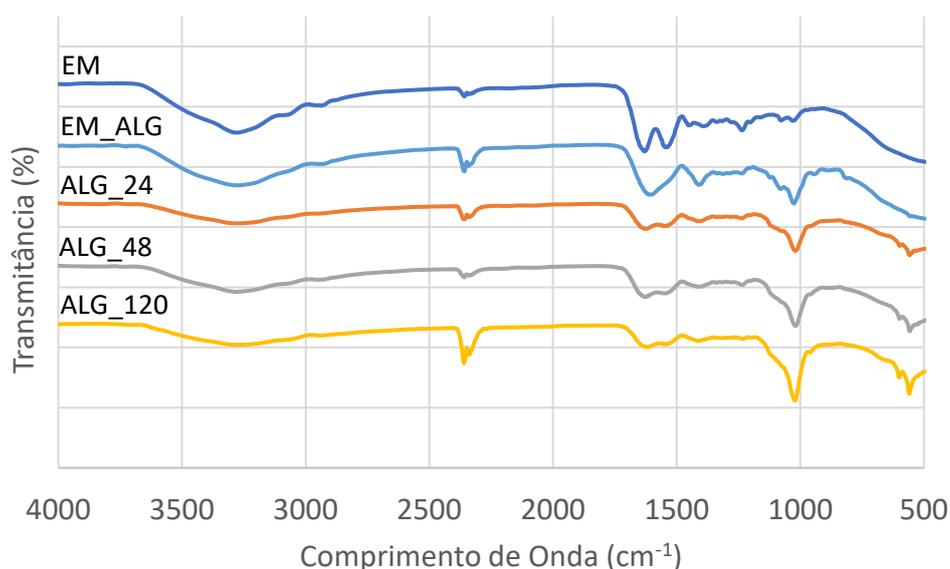


Figura 48 Gráfico do FTIR das amostras modificada com alginato imersas em 10xSBF durante 24 horas (ALG_24), 48 horas (ALG_48) e 120 horas (ALG_120).

O polímero alginato apresenta alguns bandas característicos, a 3260, 2914, 1604, 1408 e 1026 cm^{-1} . A banda larga em 3260 cm^{-1} corresponde aos grupos amina e hidroxilo; o banda com o valor de 2914 cm^{-1} é causado pelo alongamento OH; a banda de 1632 cm^{-1} corresponde à banda de absorção do carbonilo (C=O) alongamento da amida secundária (banda de amida I). Além disso, as bandas em 1604 e 1408 cm^{-1} são atribuídas a picos de alongamento assimétricos e simétricos de grupos do ácido carboxílico. Comparando a amostra de EM revestida de alginato com

a amostra sem alginato, verifica-se que apenas diferem as bandas com valor de 1026 cm^{-1} (alongamento C-O-C), atribuído à sua estrutura de sacarídeo [78]. Ao comparar o espectro da amostra apenas revestida com alginato com as amostras que estiveram imersas em solução 10xSBF durante 24, 48 e 120 horas, são notórios a existência de picos entre 556 e 580 cm^{-1} . Estas bandas podem estar atribuídos aos modos vibracionais característicos do grupo PO_4^{3-} em $\beta\text{-TCP}$ [68][71].

A análise de DRX à amostra de alginato que apresentava maior quantidade de fosfatos de cálcio está apresentado na figura seguinte.

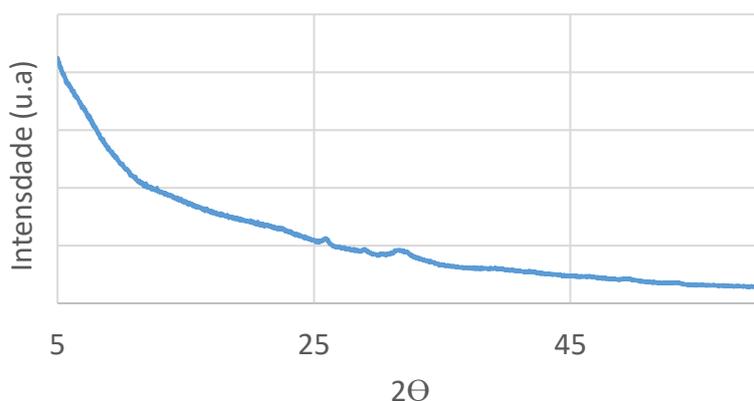


Figura 49 Gráfico do DRX de uma amostra modificada com alginato e com fosfatos de cálcio.

A análise por DRX da amostra não detetou a presença de qualquer fase característica de fosfato de cálcio, o que indica que a amostra apresenta baixa cristalinidade.

5.2.2 EM modificada com quitosano

Na figura seguinte estão representadas as várias imagens captadas pelo SEM das amostras modificada com quitosano, para os vários períodos em que as amostras estiveram imersas em 10xSBF.

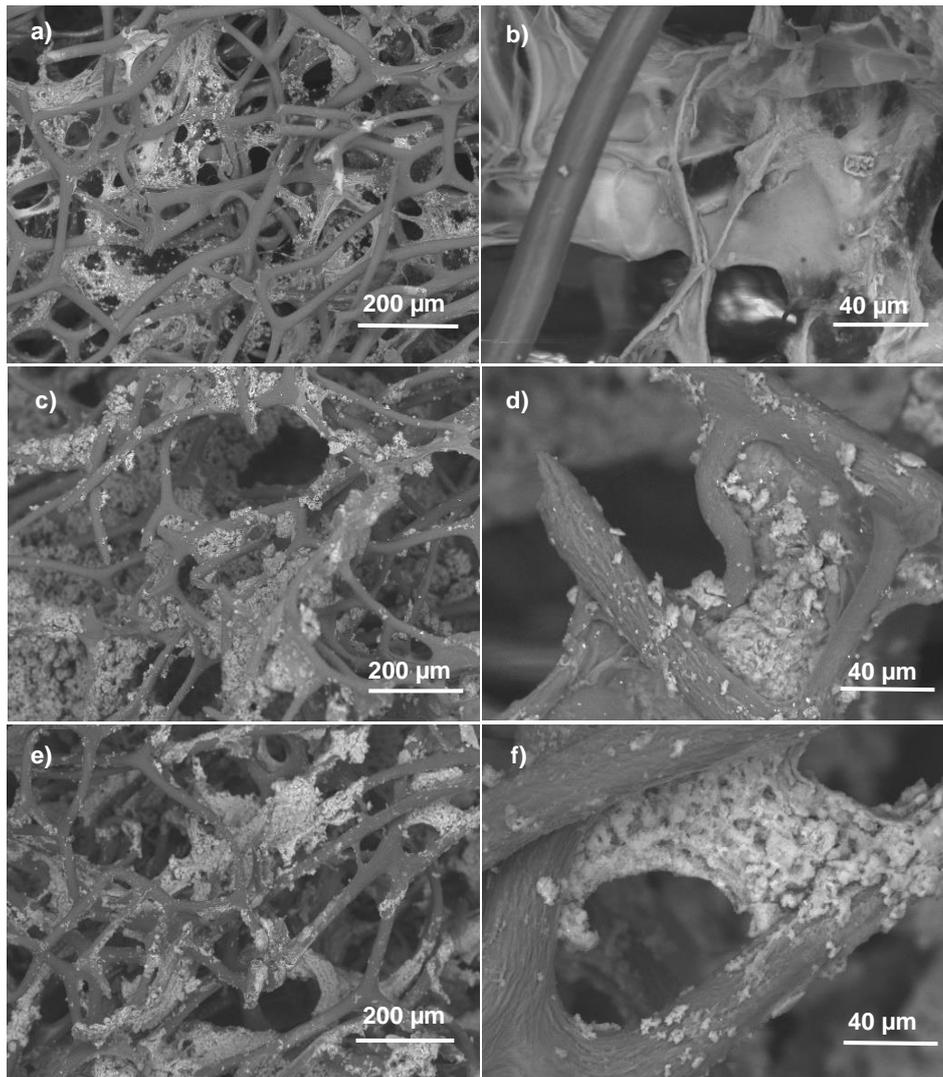


Figura 50 Imagens SEM das amostras modificada com quitosano imersas em 10xSBF durante: a) e b) 24 horas; c) e d) 48 horas e e) e f) 5 dias.

Analisando as imagens de SEM das amostras após estarem imersas em 10xSBF, é possível observar que aparentemente em todos os períodos de análise ocorreu deposição de fosfatos de cálcio. Além disso, verifica-se que estes depositam-se essencialmente nas zonas onde tem polímero e que as fibras da EM apresentam quantidade muito reduzida de fosfatos de cálcio, tal como observado anteriormente para as EM modificadas com alginato. Estes estudos foram complementados com as imagens obtidas por EDS, figura 51, que permite visualizar mais facilmente as zonas da amostra que apresentam mais fosfatos de cálcio e observar que essas zonas não correspondem às fibras da EM, que são essencialmente constituídas por carbono.

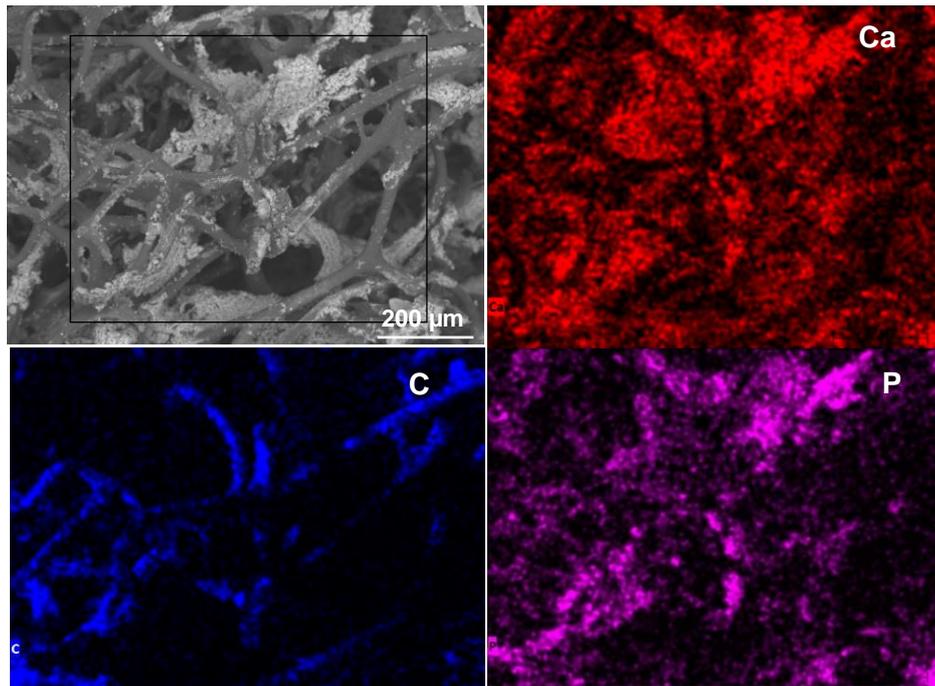


Figura 51 Mapeamento da amostra modificada com quitosano, imersas durante 24 horas em 10xSBF, obtidas por EDS.

A quantificação de fósforo e cálcio das amostras com diferentes períodos de incubação encontra-se descrita no gráfico da figura 52, juntamente com os respectivos valores de pH da solução

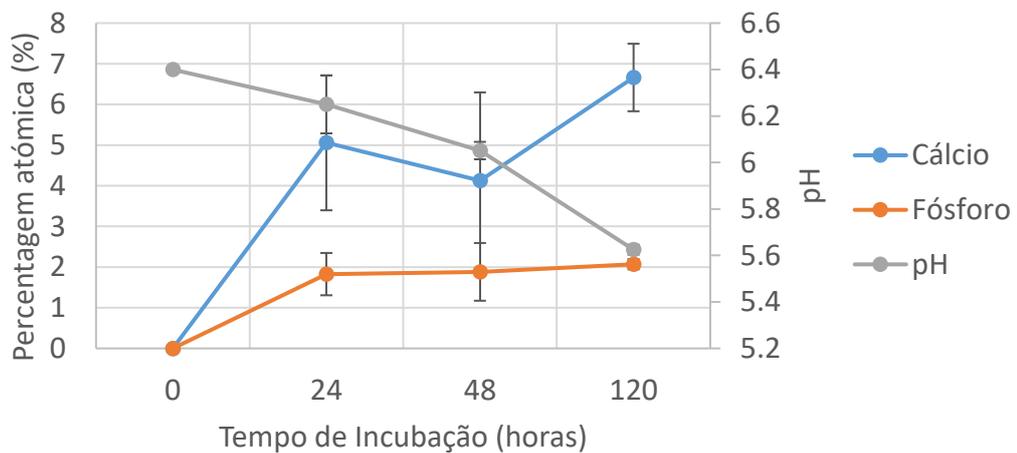


Figura 52 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras e dos valores de pH da solução após cada incubação.

Através da percentagem atômica do cálcio e fósforo observa-se que ao fim de 24 horas ocorreu bastante deposição de fosfatos de cálcio, sendo que passadas 48 horas se reduziu ligeiramente a quantidade de cálcio na amostra, obtendo assim um

rácio de Ca/P de 2.76 para o período de 24 horas e 2.19 respectivamente. No período de 5 dias a razão foi de 3.2 em que a quantidade de cálcio aumentou significativamente, no entanto o fósforo teve apenas um ligeiro aumento.

A análise de FTIR das diferentes amostras preparadas encontram-se na figura 53.

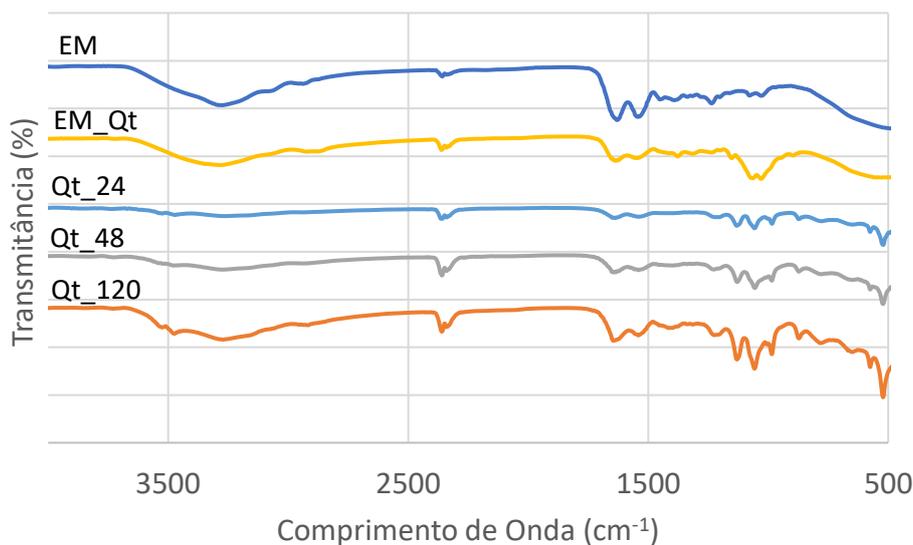


Figura 53 Gráfico do FTIR das amostras modificada com quitosano imersas em 10xSBF durante 24 horas (Qt_24), 48 horas (Qt_48) e 120 horas (Qt_120).

O quitosano apresenta bandas característicos semelhantes às da EM, portanto a EM revestida de quitosano apresenta bandas que se sobrepõem com valores de 3292, 2862, 1632, 1536, 1374, 1306, 1066 e 1020 cm^{-1} . O banda de 1632 cm^{-1} corresponde à banda de absorção do carbonilo (C = O) alongamento da amida secundária (banda de amida I), e em 1536 cm^{-1} corresponde às vibrações de flexão de N-H (resíduos N-acetilados, banda de amida II). As bandas em 1374 e 1306 cm^{-1} pertencem ao alongamento N-H das ligações amida e éter e ao alongamento N-H (banda da amida III), respectivamente. As bandas observadas em 1066 e 1020 cm^{-1} pertencem ao grupo hidroxilo secundário (pico característico de -CH-OH em álcoois cíclicos) e o grupo hidroxilo primário (pico característico de -CH₂-OH em álcoois primários) [78]. Observando os espectros das amostras que estiveram em solução 10XSBF verifica-se a presença de bandas, nomeadamente em 550-600, 960, 1020 cm^{-1} .

¹, que podem ser identificadas como frequências características dos modos vibracionais do grupo PO_4^{3-} em $\beta\text{-TCP}$ [68][71].

Através da análise por DRX das amostras, não foi possível identificar a fase dos fosfatos de cálcio, pois o facto da amostra não ser cristalina dificulta a deteção destes.

5.3. EM modificada com corantes

As amostras de EM foram modificadas através da adsorção de dois corantes, rodamina B e azul de metileno. O MB e a RB são corantes que possuem ampla aplicação industrial, mas causam sérios problemas ambientais devido à sua alta toxicidade e acumulação no meio ambiente [79]. Até agora, muitos esforços foram feitos para remover ou separar estes corantes da água e através das investigações realizadas nessa área verificaram que as EM acumulam quantidades significativas de poluentes e podem, portanto, contribuir para preservar a qualidade da água ou mesmo descontaminar as zonas poluídas [75].

Sabendo dessa característica das EM, para a adsorção de corantes, espera-se tirar partido dos grupos funcionais destes, presentes na figura 54, e investigar se de facto promovem o crescimento de fosfatos de cálcio na superfície das EM.

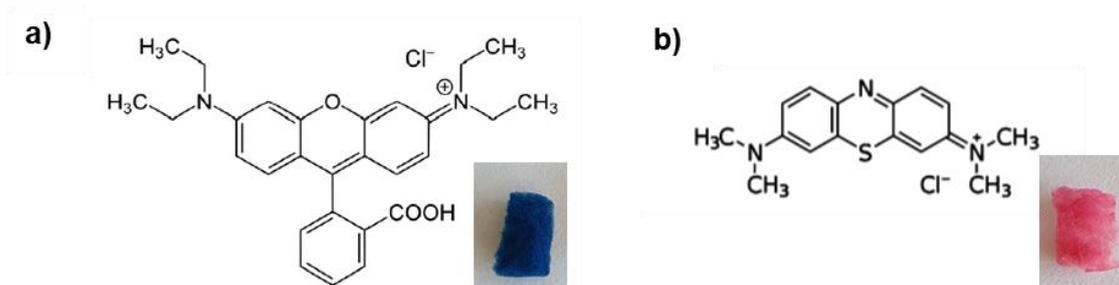


Figura 54 Grupos Funcionais dos corantes: a) RB e b) MB.

6.3.1 EM modificada com RB

Na figura seguinte estão apresentadas as imagens SEM das amostras com RB que estiveram incubadas e em agitação na solução 10XSBF para os diferentes tempos de incubação (24 e 48 horas e 5 dias).

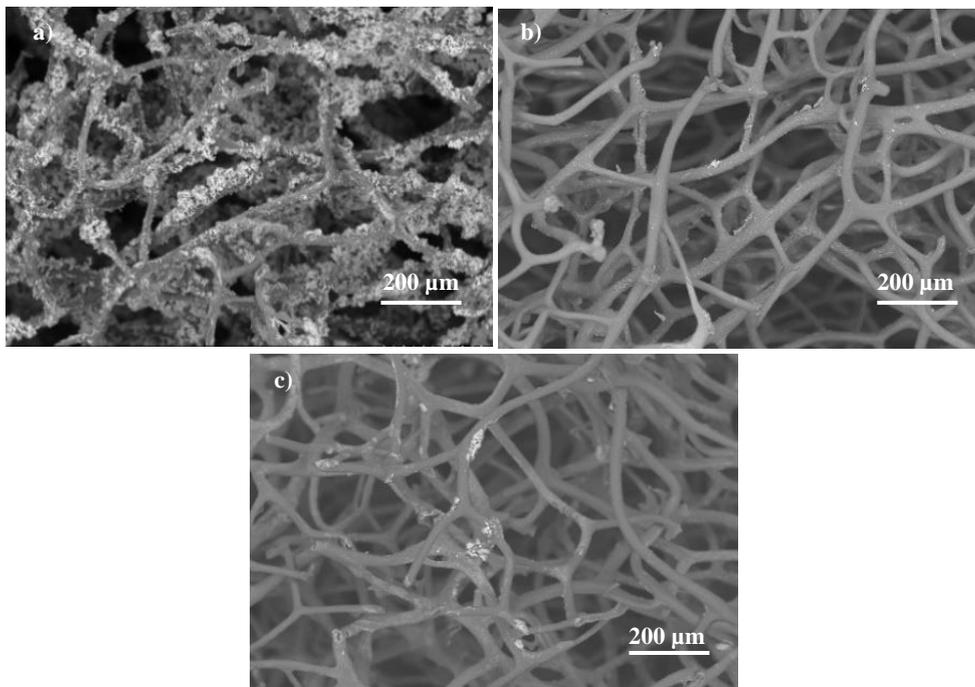


Figura 55 SEM com ampliação x200 das amostras com corante RB incubadas em 10Xsbf no período de a)24 horas; b)48 horas e c)15 dias.

Analisando os resultados morfológicos das amostras que foram revestidas com corante RB e colocadas em solução 10xSBF, verifica-se que ao fim de 24 horas de incubação, foram depositados bastantes fosfatos de cálcio na amostra. É visível que os fosfatos de cálcio ficaram depositados de forma homogênea tanto no interior como na superfície da amostra, no entanto as fibras da EM não ficaram totalmente cobertas de fosfatos de cálcio. No período de 48 horas e 5 dias de incubação a amostra apenas apresentou vestígios de fosfatos de cálcio na sua superfície.

Para complementar a análise morfológica, foi realizado EDS que quantificou os valores de cálcio e fósforo presentes nas amostras. A percentagem atômica destes

elementos nas amostras e o pH da solução após a incubação destas encontram-se mencionados nos gráficos da figura 56.

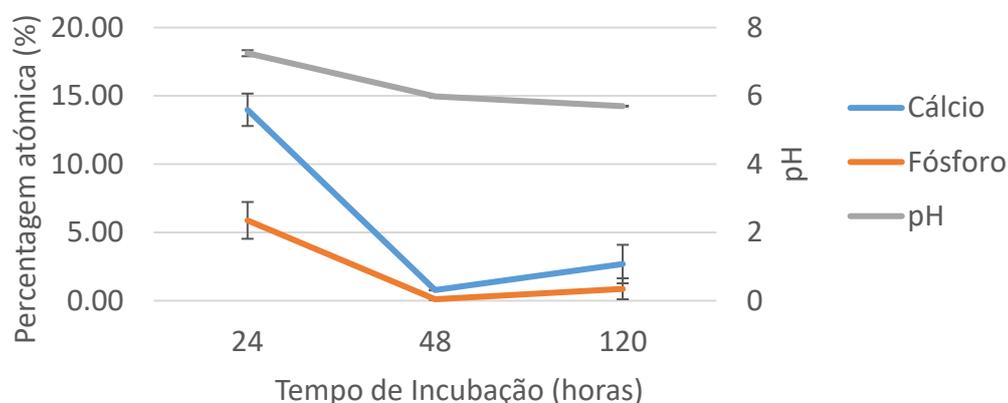


Figura 56 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras com RB e dos valores de pH da solução após cada incubação.

Através da observação do gráfico, é possível verificar que não ocorreu grande variação do pH das soluções nos períodos analisados. Ao fim de 24 horas de incubação, solução apresentou um pH neutro, 7.24, e ao longo do tempo diminuiu ligeiramente ficando cada vez mais ácida, sendo que após 5 dias de incubação atingiu o valor de 5.6. Relativamente às percentagens atômicas de cálcio e fósforo, estas são mais elevadas no período de 24 horas, diminuindo praticamente na sua totalidade ao fim de 48 horas e 5 dias. O razão Ca/P apresentou valores entre 2.38 e 3, que correspondem à fase ACP [67].

A figura 57 revela a análise de micro-CT da amostra com RB antes e após 24 horas de incubação em 10xSBF.

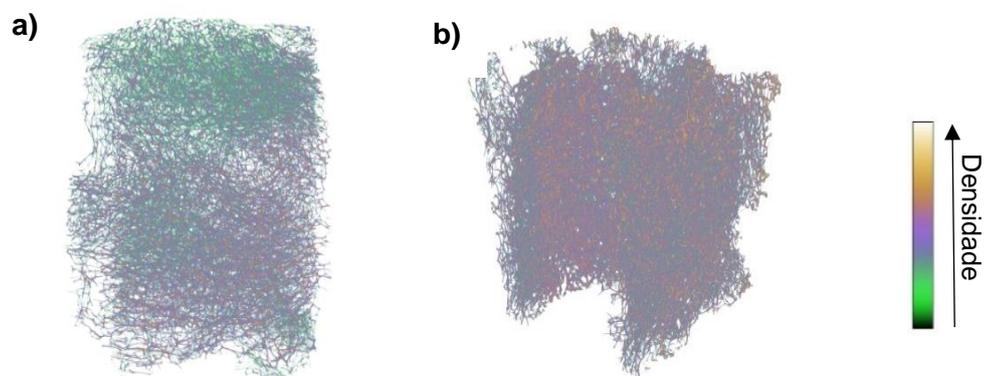


Figura 57 Imagens obtidas por micro-CT das amostras com RB: a) antes da imersão em 10xSBF e b) após 24 horas em 10xSBF.

Através das imagens obtidas por micro-CT é possível observar que a imagem da amostra após a incubação em 10xSBF apresenta maior densidade atribuída aos fosfatos de cálcio presentes na amostra.

A presença dos fosfatos de cálcio na superfície das esponjas de mar foi também analisada por FTIR (Figura 58).

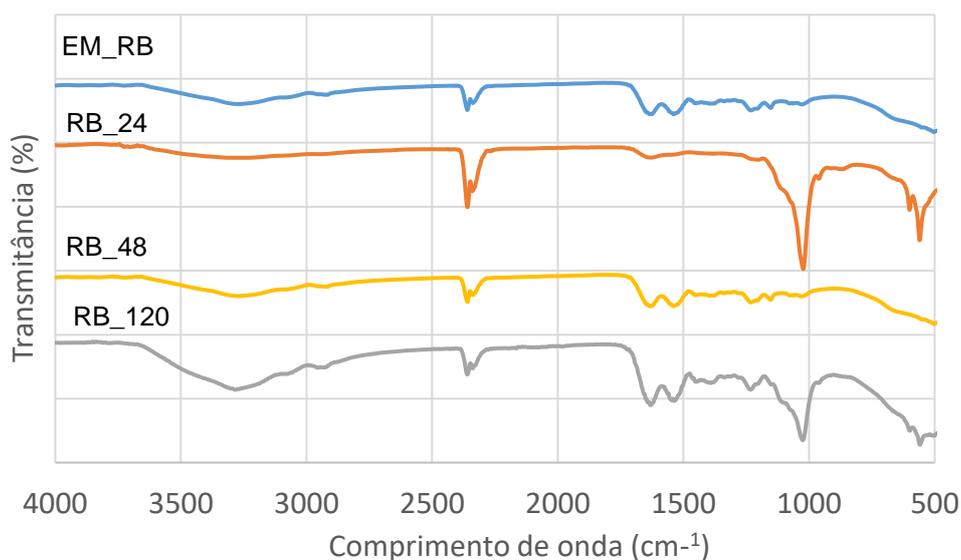


Figura 58 Gráfico do FTIR das amostras revestidas do corante RB imersas em 10xSBF durante 24 horas (RB_24), 48 horas (RB_48) e 120 horas (RB_120).

O corante RB apresenta bandas características no FTIR, tais como a banda a 3400 cm^{-1} que corresponde ao alongamento de $-\text{NH}_3$. A banda em 2926 cm^{-1} indica a banda de alongamento de $-\text{CH}$. A banda em 1642 cm^{-1} que pode ser atribuído à banda de alongamento de $\text{C}=\text{O}$ da amida. A banda em 1406 cm^{-1} é atribuída ao alongamento da vibração indicativa do anel benzênico. Outras bandas características como 1077 cm^{-1} , corresponde ao alongamento $-\text{OH}$ do anel aromático, e 619 cm^{-1} adequa-se os álcoois primários e ácido sulfúrico ($-\text{S}=\text{O}$) [80].

No entanto nos espectros da figura 58 apenas são evidentes as bandas características da EM. No espectro das amostras com o período de 24 horas é notório a presença da banda $560\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ que é característica do grupo PO_4^{3-} em $\beta\text{-TCP}$, bem como as bandas a 875 e 1020 cm^{-1} que também pertencem ao mesmo grupo [68][71].

A análise de DRX foi realizada para a amostra de EM modificada com RB que apresentava maior quantidade de fosfatos de cálcio (24h). Porém esta análise não detetou a presença a presença de qualquer fase cristalina, tal como observado anteriormente.

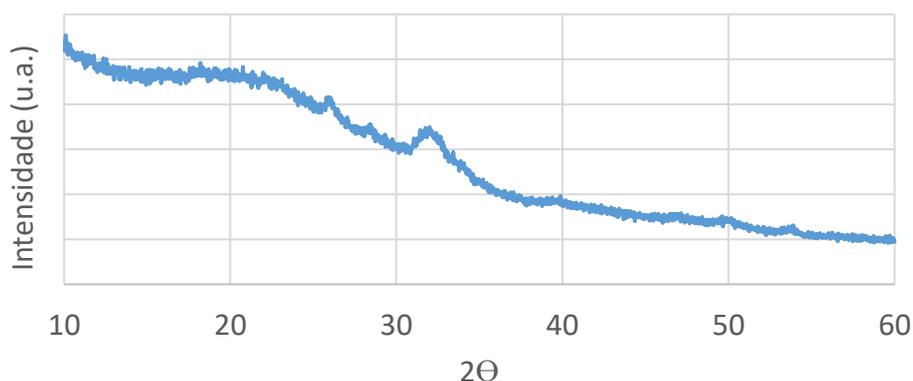


Figura 59 Gráfico do DRX de uma amostra modificadas com RB e com fosfatos de cálcio.

5.3.2 EM modificada com MB

Na figura abaixo estão representadas as várias imagens obtidas por SEM das amostras recobertas de MB para os períodos de incubação de 24, 48 e 120 horas.

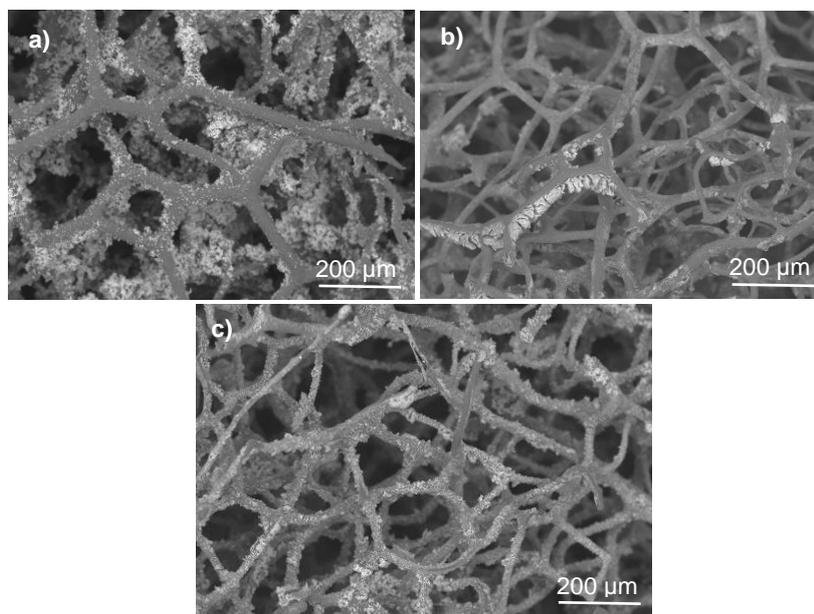


Figura 60 SEM com ampliação x200 das amostras com corante MB incubadas em 10xSBF no período de a) 24 horas; b) 48 horas e c) 120 horas.

Observando as imagens SEM, é possível observar que no período de 24 horas a amostra apresentou recobrimento de praticamente todas as fibras de fosfatos de cálcio. O recobrimento pareceu ser maior e mais homogêneo nas fibras do interior da amostra do que nas fibras superficiais. Para o período de 48 horas, é notório que ocorreu uma redução drástica da quantidade de fosfatos de cálcio presentes na superfície da EM. Em relação às EM que estiveram incubadas na solução durante 5 dias, verificou-se que ocorreu novamente deposição de fosfatos de cálcio. Nesta amostra o recobrimento das fibras com fosfatos de cálcio pareceu ser homogêneo.

Posteriormente foi realizado o EDS às mesmas amostras, que permitiu quantificar os elementos presentes. Os resultados obtidos mostraram que as percentagens atômicas do cálcio e fósforo, apresentadas na figura 61 apresentaram um valor máximo de cálcio e fósforo ao 5º dia. O rácio Ca/P apresentou valores entre 2.50 e 3.14. Na mesma figura estão ainda descritos os valores de pH da solução em que as amostras ficaram incubadas.

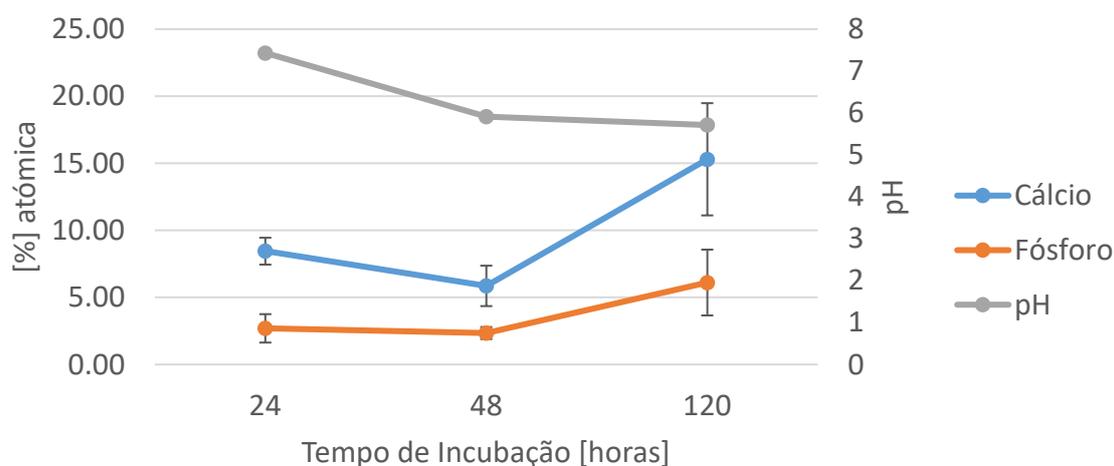


Figura 61 Evolução das percentagens atômicas de cálcio e fósforo das amostras com MB e dos valores de pH da solução após cada incubação.

Analisando os resultados, verificou-se que o pH da solução em que as amostras estiveram incubadas foi diminuindo ao longo do tempo, mantendo-se com valor idêntico no intervalo entre 48 horas e 5 dias.

Na figura seguinte está apresentado os resultados obtidos por FTIR às amostras modificadas com MB e incubadas em 10XSBF nos períodos definidos.

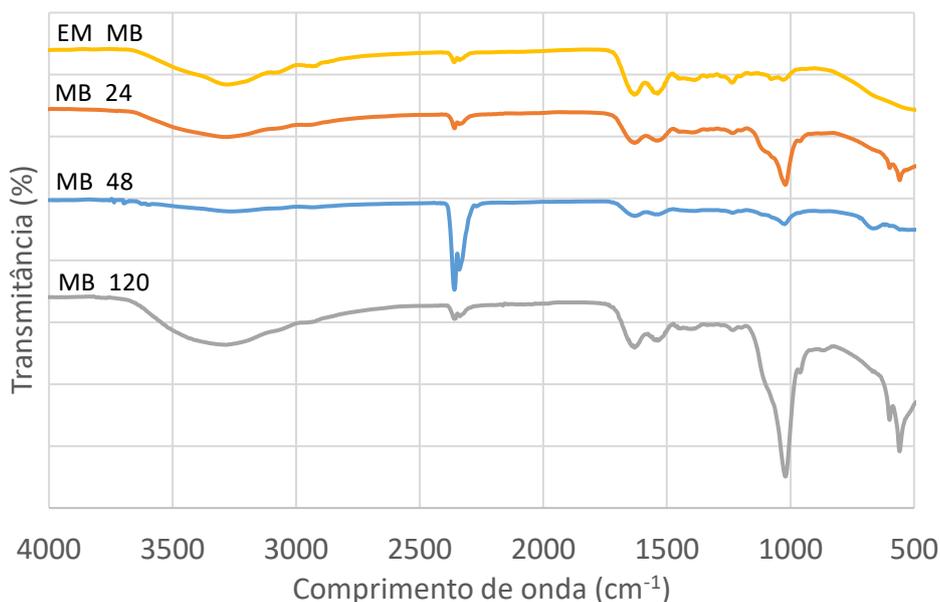


Figura 62 Gráfico do FTIR das amostras modificadas com corante MB imersas em 10xSBF durante 24 horas (MB_24), 48 horas (MB_48) e 120 horas (MB_120).

O corante MB apresenta bandas características, como o 2816, 2720 cm^{-1} , que representam a vibração de alongamento dos grupos metil $-\text{CH}-$ aromático e $-\text{CH}_3$. Além desses, o MB apresenta bandas em 1591 a 1363 cm^{-1} , que são atribuídos às estruturas do anel aromático em azul de metileno e em 1170 cm^{-1} , que está relacionado ao esqueleto $\text{C} = \text{C}$ dos anéis aromáticos [81]. No entanto estas bandas não são visíveis na amostra de EM modificada com MB, sendo observáveis apenas os picos característicos da EM [81]. Observando o espectro das amostras modificadas com MB para o período de incubação de 24 horas é notório a presença da banda 560-600 cm^{-1} características do grupo PO_4^{3-} em β -TCP, bem como as bandas a 875 e 1020 cm^{-1} que também pertencem ao mesmo grupo [68][71].

5.4. Conclusão

Este estudo permitiu analisar a influência de diferentes modificações da superfície das amostras de EM para a deposição de fosfatos de cálcio.

Em relação às amostras modificadas com polieletrólitos PEI+PSS, verificou-se que a deposição de fosfatos de cálcio na amostra só ocorreu após 48 horas de

incubação em 10xSBF. No entanto verificou-se que para maiores períodos de incubação os fosfatos de cálcio foram eliminados da superfície da EM. Estes resultados mostram que a fixação dos fosfatos de cálcio com a superfície da EM modificada com polieletrólitos não é suficientemente forte para evitar a lixiviação ao longo do tempo de agitação. Estes resultados são condizentes com os resultados obtidos pelo crescimento direto de fosfatos de cálcio na superfície das EM.

As amostras modificadas com os corantes apresentaram resultados semelhantes entre elas pois tanto nas amostras modificadas com RB como com MB, a deposição de fosfatos de cálcio ocorreu ao fim de 24 horas de incubação 10xSBF. No entanto, também se verificou que ao fim o de 48 horas os fosfatos de cálcio presentes na superfície das EM também foram lixiviados.

No caso das amostras modificadas com os polímeros naturais, alginato e quitosano, verificou-se que ao fim de 24 horas de incubação em 10xSBF ocorreu formação de cálcio e fósforo em maior quantidade na superfície das EM, quando comparando com as amostras modificadas com as outras abordagens descritas anteriormente. Foi possível também observar que essa deposição ocorreu essencialmente nas zonas da amostra que continham polímero. Além disso, verificou-se que a fixação dos fosfatos de cálcio com os biopolímeros foi resistente o suficiente para manter a quantidade de fosfatos de cálcio durante o período máximo de incubação. Dado que as amostras de EM revestidas com polímeros naturais revelaram ser uma abordagem mais eficiente, estas foram escolhidas para serem usadas em in vitro com células osteoblásticas MC3T3-E1.

6. Ensaio Celulares

6.1. Estudos de biocompatibilidade

O termo de viabilidade celular refere-se a dois aspetos: o saudável, que corresponde à presença de células vivas com capacidade de se reproduzirem e à morte celular. A viabilidade celular foi calculada com base na atividade metabólica dos *scaffolds* carregados de células após 1, 3 e 7 dias de cultura, através do método de resazurina. Os resultados obtidos através desse método, relativamente às amostras de EM sem e com fosfatos de cálcio (EM+CaP), encontram-se descritos no gráfico da figura 63. Foram ainda efetuadas análises de SEM na superfície de todas amostras para a avaliação da morfologia celular e a sua modificação com o tempo de cultura.

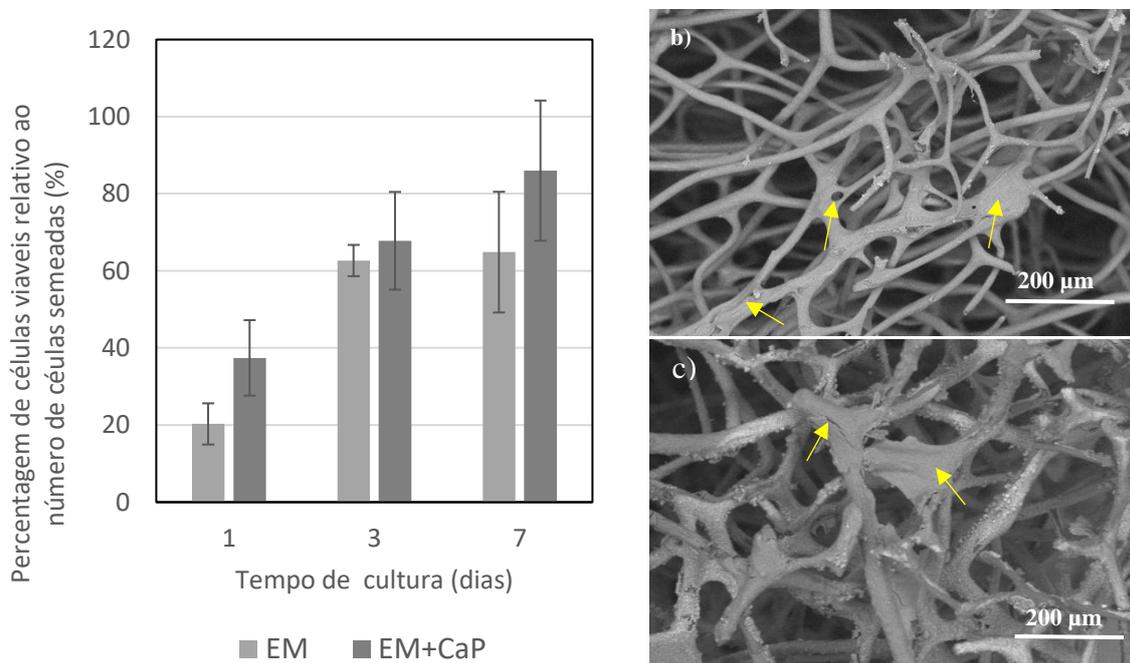


Figura 63 a) Gráfico da percentagem de células viáveis nas amostras EM e EM com fosfatos de cálcio (EM+CaP); b) SEM da EM ao 7º dia de cultura; c) SEM da EM com fosfatos de cálcio ao 7º dia de cultura.

Ao analisar o gráfico da figura 6.1, verifica-se que a viabilidade celular da EM aumentou consideravelmente entre o primeiro dia de cultura e o terceiro (cerca de 40%). Comparando a EM com a EM com fosfatos de cálcio, esta última apresentou níveis mais elevados de viabilidade celular em todos os dias de cultura. No sétimo dia de cultura as duas EM apresentaram a maior discrepância nos valores de viabilidade. A EM com fosfatos de cálcio apresentou uma viabilidade de 87%, enquanto que a viabilidade da EM foi de 64%. Ou seja, é possível afirmar que os fosfatos de cálcio promoveram maior adesão e mais proliferação das células na sua superfície. Uma das razões que poderá ter contribuído para essa viabilidade celular é o facto da amostra que apresenta fosfatos de cálcio ter mais zonas para as células poderem aderir [67].

Em relação às imagens SEM, é possível observar a presença das células tanto na amostra de EM como na amostra de EM com fosfatos de cálcio. Verifica-se que as células migraram pelos canais da matriz da EM e cobriram na totalidade zonas onde os poros são mais pequenos.

Relativamente à viabilidade celular das amostras com alginato (EM+ALG+CaP), os seus resultados estão apresentados na figura 64.

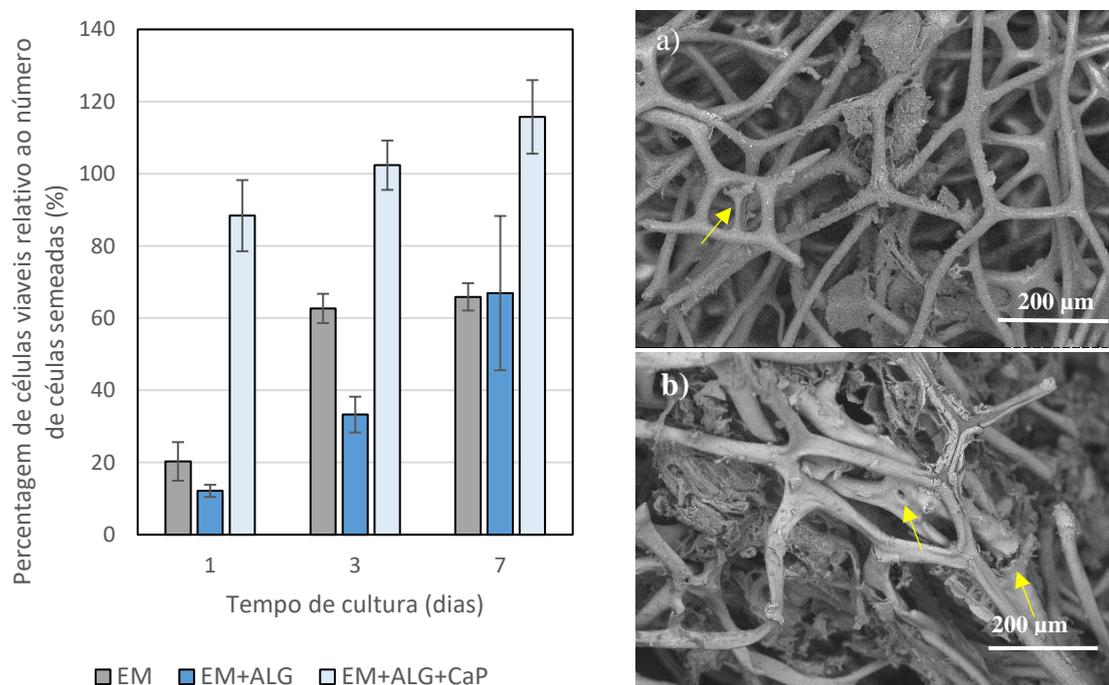


Figura 64 a) Gráfico da percentagem de células viáveis nas amostras EM, EM com alginato e EM com alginato e fosfatos de cálcio; b) SEM da EM com alginato ao 7º dia de cultura; c) SEM da EM com alginato e fosfatos de cálcio com fosfatos de cálcio ao 7º dia.

Pela análise dos resultados obtidos da EM com alginato é notório que a viabilidade celular dessa amostra foi inferior à da EM para quase todos os tempos de cultura, exceto no sétimo dia de cultura em que a EM com alginato apresentou um valor ligeiramente superior em relação ao da EM (diferença de 2%). No entanto, verifica-se que a amostra de EM com alginato e fosfatos de cálcio apresentou níveis bastante elevados de viabilidade celular nos três tempos de cultura (entre 93% a 108%). Dessa forma, pode-se concluir que os fosfatos de cálcio tiveram maior contribuição para a viabilidade celular em comparação com o alginato.

Observando as imagens SEM, observa-se a presença de células tanto na EM revestida de alginato sem fosfatos de cálcio como com a amostra com fosfatos de cálcio. No entanto, consegue-se observar mais células nesta última amostra. Verifica-se ainda, que na amostra revestida de alginato ocorreu degradação da maioria do polímero que estava presente na amostra, provavelmente devido a este polímero ser solúvel em água. Em relação à amostra com fosfatos de cálcio, é visível que o polímero e os fosfatos de cálcio mantiveram-se na amostra, indo de encontro aos resultados mencionados gráfico.

Em relação aos resultados da viabilidade celular relativamente às amostras com quitosano (EM+QUI+CaP), estes estão mencionados na figura 65.

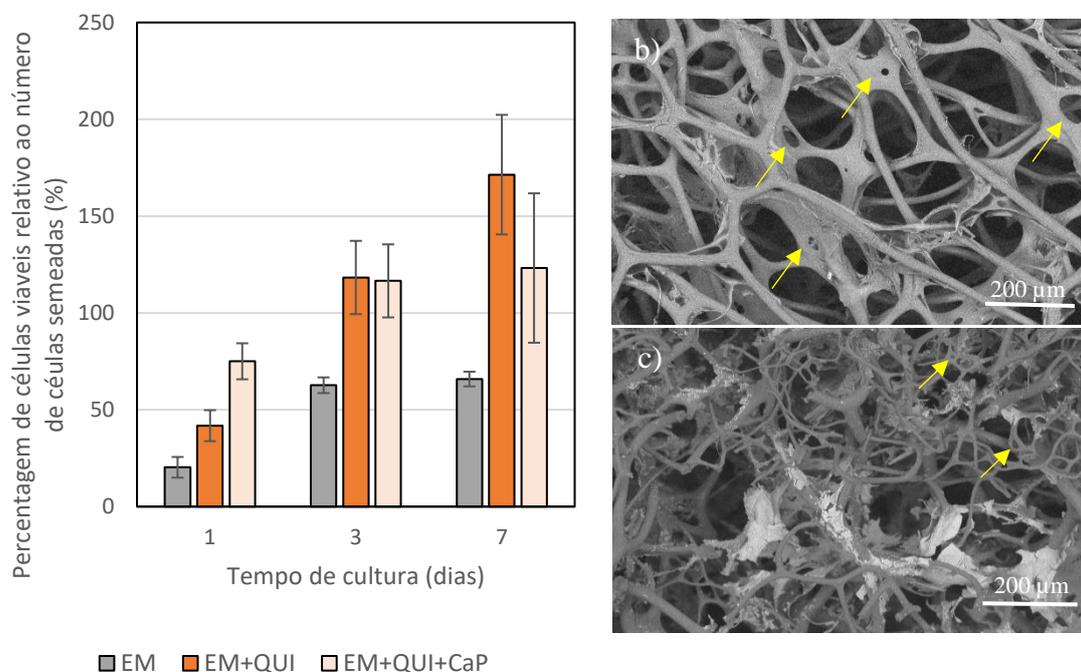


Figura 65 a) Gráfico da percentagem de células viáveis nas amostras EM, EM com quitosano e EM com quitosano e fosfatos de cálcio; b) SEM da EM com quitosano ao 7º dia de cultura; c) SEM da EM com quitosano e fosfatos de cálcio com fosfatos de cálcio ao 7º dia.

Em relação à amostra de EM revestida apenas com quitosano, esta apresentou resultados de viabilidade mais positivos em comparação à EM, atingindo o valor máximo de 171% de células viáveis no sétimo dia de cultura. Relativamente às amostras com fosfatos de cálcio, no primeiro dia de cultura a percentagem de células viáveis foi 41% superior à amostra sem fosfatos de cálcio. No terceiro dia de cultura, a amostra com fosfatos de cálcio apresentou uma ligeira redução na percentagem de células viáveis (2%) em comparação com a amostra sem fosfatos de cálcio. Ao fim de 7 dias de cultura, a amostra com fosfatos de cálcio teve um ligeiro aumento na quantidade de células viáveis em comparação com o terceiro dia de cultura. No entanto, em comparação com a amostra sem fosfatos de cálcio, a amostra com fosfatos de cálcio apresentou uma menor viabilidade celular. Esta diminuição poderá ter sido devido a essa amostra apresentar uma quantidade inferior de fosfatos de cálcio em relação às amostras analisadas nos restantes tempos de cultura ou pelo facto da fase de fosfatos de cálcio presente nas amostras ser o TCP e este ser solúvel em água levando assim à sua degradação aquando um período longo de cultura [67]. Além disso, as mudanças de meio poderão ter influenciado este resultado. Assim, é possível afirmar que o polímero aumenta a viabilidade celular da EM [82]. No entanto, não é notório que influencie diretamente quando a amostra tem fosfatos de cálcio, mas o facto deste estar presente na amostra permite que os fosfatos de cálcio se mantenham mais aderidos à amostra evitando uma maior degradação destes e levando a um aumento da viabilidade celular. Assim sendo é possível afirmar que o quitosano e os fosfatos de cálcio contribuem para a viabilidade celular, porém é difícil saber qual deles influencia mais, dado que o desvio padrão é um pouco elevado. Isto poderá ser devido às amostras apresentarem diferentes quantidades de fosfatos de cálcio ou então pelas sucessivas mudanças de meio.

Analisando as imagens de SEM das amostras EM revestidas de quitosano, é possível observar a presença do polímero na amostra, visto que ao contrário do alginato, o quitosano não é solúvel em água [78]. Além disso, observa-se a presença de grande quantidade de células na mesma amostra. Em relação à amostra revestida de quitosano com fosfatos de cálcio, é visível tanto as células com o polímero e os fosfatos de cálcio.

De modo a comparar os resultados obtidos da viabilidade celular de cada amostra com fosfatos de cálcio foi realizado um gráfico que está mencionado na figura seguinte.

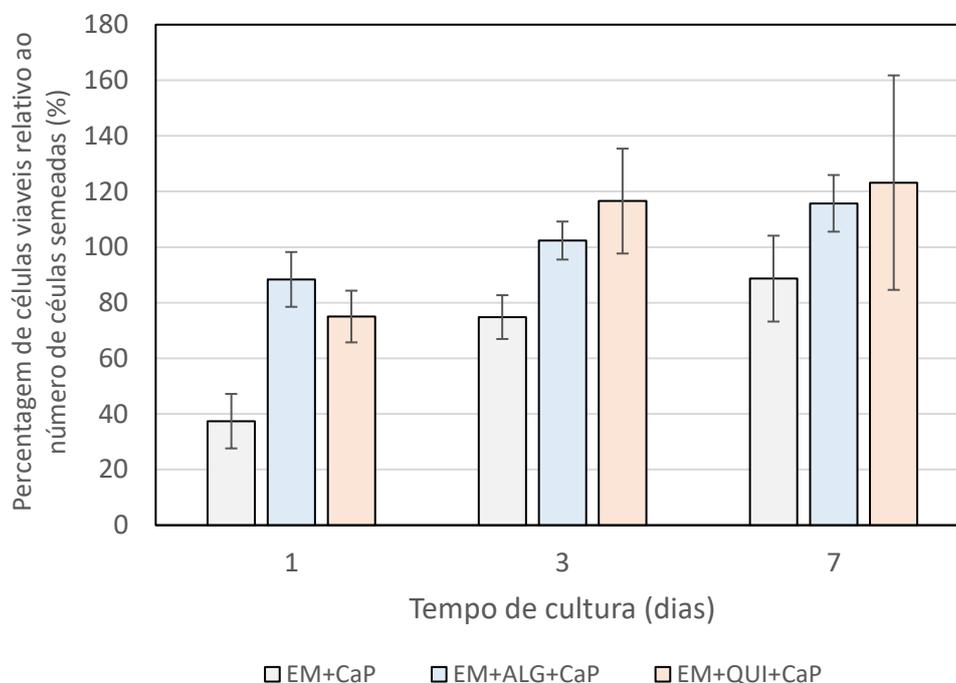


Figura 66 Gráfico da porcentagem de células viáveis nas amostras com fosfatos de cálcio na EM, EM modificada com alginato (EM+ALG+CaP) e EM modificada com quitosano (EM+QUI+CaP).

Pela observação do gráfico da figura 65, verifica-se que as amostras revestidas de polímeros naturais apresentaram maior viabilidade em relação à amostra sem revestimento. Ao fim de 7 dias, as amostras revestidas de quitosano tiveram uma porcentagem de células viáveis ligeiramente superior às amostras revestidas de alginato, 123.20% para as amostras com quitosano e 115.74% para as amostras com alginato. Mas é importante ter em conta que a maior viabilidade nas amostras revestidas com quitosano poderá ser apenas provocado pela presença de quitosano, como previamente descrito.

6.2. Mineralização Celular

Os osteoblastos podem ser induzidos a produzir cálcio *in vitro*. Este processo é denominado mineralização. A quantificação da mineralização celular foi efetuada através da deteção de cálcio em combinação com um ensaio colorimétrico de alizarin

red. É de notar que aos valores de densidade ótica das amostras foi subtraído o valor relativo ao controlo negativo (amostra sem células) de forma não contabilizar os fosfatos de cálcio já presentes nas amostras. Os resultados das amostras EM e EM com fosfatos de cálcio, estão apresentados na figura seguinte.

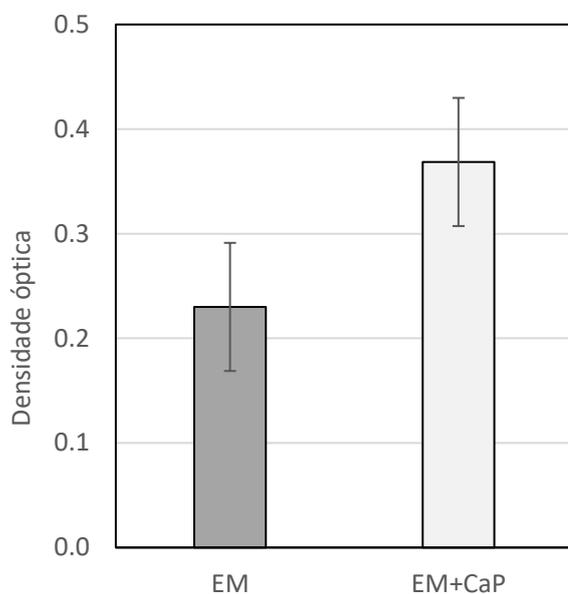


Figura 67 Gráfico com valores de densidade ótica das amostras de EM com e sem fosfatos de cálcio ao fim de 7 dias de cultura.

Ao observar o gráfico, verifica-se que a EM com fosfatos de cálcio apresenta um valor de densidade ótica mais elevado comparativamente à amostra de EM, 0,369 e 0,230 respetivamente. Ou seja, a EM com fosfatos de cálcio induziu a produção de mais fosfatos de cálcio.

Relativamente aos resultados da mineralização realizada às amostras com alginato e quitosano, estes estão mencionados no gráfico da figura 68.

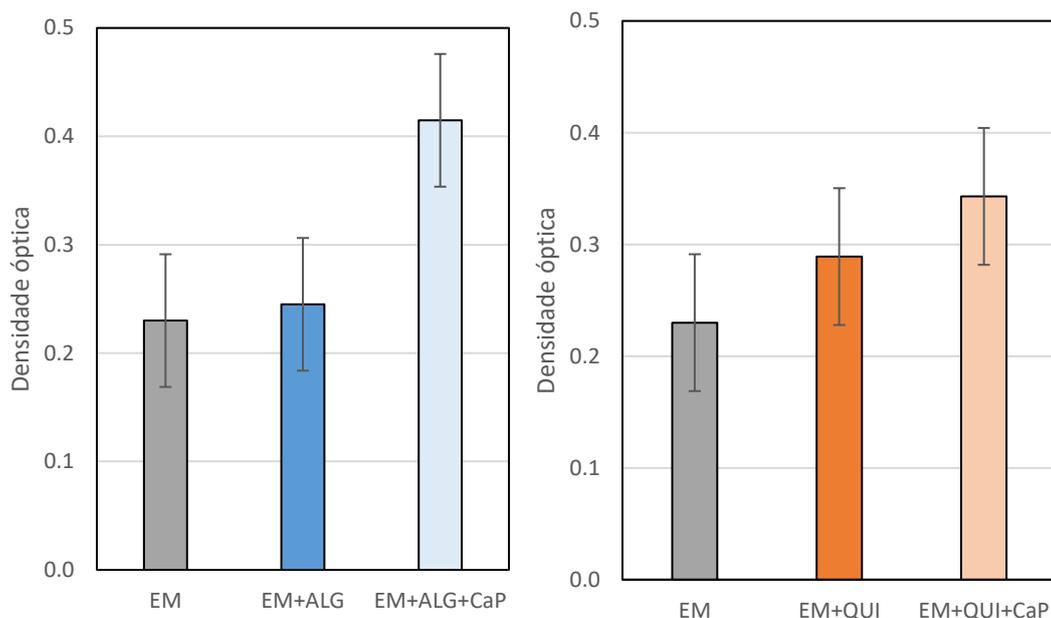


Figura 68 Gráfico com valores de densidade óptica das amostras de EM revestidas com os polímeros naturais, alginato e quitosano, com e sem fosfatos de cálcio ao fim de 7 dias de cultura.

Observando o gráfico a da figura 68, verifica-se que a amostra com alginato apresenta um valor de densidade óptica de 0.245, superior à amostra EM. Em relação à amostra com alginato e fosfatos de cálcio, esta possui um valor de 0.415, bastante mais elevado aos das restantes amostras. Através destes resultados, é possível afirmar que o polímero teve uma ligeira influência na deposição de fosfatos de cálcio. No entanto, a amostra que continha fosfatos de cálcio, estes tiveram maior influência nesse aumento.

Em relação ao gráfico b da figura 68, é possível observar que ocorreu um aumento de mineralização tanto na amostra revestida com quitosano sem fosfatos de cálcio como com a amostra com fosfatos de cálcio. No entanto não é fácil identificar se a influência foi do quitosano ou dos fosfatos de cálcio, pois os valores de densidade óptica das duas amostras não apresentaram grande discrepância, 0.289 no caso da amostra sem fosfatos de cálcio e 0.343 em relação à amostra com fosfatos de cálcio.

6.2. Conclusão

Os estudos realizados demonstraram que os materiais desenvolvidos apresentam níveis de bioatividade e biocompatibilidade elevados. A biocompatibilidade dos materiais foi analisada através da incubação de osteoblastos. Foi verificado que as células aderiram e proliferaram nas suas superfícies com níveis elevados de viabilidade celular. As análises por SEM revelaram que as células se encontravam bem distribuídas na superfície das EM.

Com os valores obtidos de células viáveis nas diferentes amostras, verifica-se que a viabilidade aumenta progressivamente ao longo do período de cultura em todas as amostras. Além disso, pôde-se observar que as amostras com polímeros naturais e fosfatos de cálcio apresentaram valores semelhantes entre si e superiores às amostras de EM com fosfatos de cálcio. Ao fim do primeiro dia de cultura a amostra com alginato e fosfatos de cálcio destacou-se apresentando maior percentagem de células viáveis. Enquanto que no dia 3 e no dia 7 as amostras com quitosano e fosfatos de cálcio tiveram a percentagem de viabilidade mais elevada.

Relativamente aos resultados da mineralização realizados ao fim de 7 dias de cultura, as amostras com alginato e fosfatos de cálcio foram as que apresentaram resultados melhores, obtendo um valor de densidade ótica de 0.415.

7. Conclusões e Perspetivas Futuras

Este trabalho permitiu tirar conclusões significativas quer relativamente à preparação dos nanocompósitos à base de EM modificada com fosfatos de cálcio quer relativamente aos estudos do seu desempenho biológico. Relativamente à preparação dos nanocompósitos verificou-se que para a etapa de purificação das EM, o método que mostrou ser mais eficaz foi a purificação com HCl. As amostras de EM imersas em 10xSBF apresentaram um crescimento mais acentuado de fosfatos de cálcio em comparação às amostras imersas em SBF. Em relação às EM modificadas com polímeros naturais, polieletrólitos ou moléculas, verificou-se que a abordagem que utilizou os polímeros naturais promoveu uma maior deposição de fosfatos de cálcio. Para além disso verificou-se que nestas amostras os fosfatos de cálcio persistiram na sua superfície ao longo do período máximo de incubação.

Em termos de desempenho biológico dos nanocompósitos à base de EM, verificou-se através dos estudos *in vitro* com células osteoblásticas que as amostras revestidas de quitosano apresentaram uma percentagem de viabilidade celular ligeiramente superior às amostras revestidas de alginato, 123.20% para as amostras com quitosano e 115.74% para as amostras com alginato. No entanto, observou-se que as amostras de EM com alginato apresentaram um maior nível de mineralização quando comparadas com as amostras de EM modificadas com quitosano. Com o presente trabalho foi possível desenvolver novos materiais nanocompósitos de EM com fosfatos de cálcio com elevado potencial para aplicações futuras na regeneração óssea. Como consideração final estima-se que os nanocompósitos produzidos podem ser promissores no campo da medicina regenerativa óssea pois compilam qualidades de biodegradabilidade, bioatividade, biocompatibilidade, resistências mecânicas à compressão adequadas para a regeneração óssea, em particular para o osso trabecular.

Nos materiais nanocompósitos preparados durante este trabalho, existem ainda várias propriedades que podem ser otimizadas e outras que necessitam ser

mais exploradas. Um aspecto que poderá aumentar a formação e deposição de fosfatos de cálcio nas amostras será explorar outras soluções de SBF. Para melhor investigar as propriedades bioativas dos scaffolds poderão ser feitos ensaios celulares mais prolongados contemplando prazos acima dos 30 dias. Para além disso podem também ser implementados estudos de estimulação mecânica dinâmica em culturas celulares, de modo a induzir uma maior difusão e proliferação celular.

Bibliografia

- [1] Z. H. and Y. S. Huawei Qu, a Hongya Fu, "Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds : a review," *RSC Adv.*, pp. 26252–26262, 2019.
- [2] J. Henkel *et al.*, "Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective," *Bone Research*, Sichuan University, pp. 216–248, 2013.
- [3] P. N. Christy *et al.*, "Biopolymeric nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications – A review," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 55, p. 18, 2020.
- [4] P. Sharma, P. Kumar, R. Sharma, V. D. Bhatt, and P. S. Dhot, "Tissue Engineering ; Current Status & Futuristic Scope," *J. Med. Life*, vol. 12, pp. 225–229, 2019.
- [5] S. Pina, J. M. Oliveira, and R. L. Reis, "Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review," *Adv. Mater*, pp. 1–27, 2015.
- [6] A. Eltom, G. Zhong, and A. Muhammad, "Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes : A Review," *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2019, p. 13, 2019.
- [7] R. A. M. Fontes, "Fabrico e Caracterização de Scaffolds à Base de Fosfatos de Cálcio," 2010.
- [8] S. Mondal and U. Pal, "3D hydroxyapatite scaffold for bone regeneration and local drug delivery applications," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 53, p. 11, 2019.
- [9] T. M. Shick, A. Zuhra, and A. Kadir, "A review of biomaterials scaffold fabrication in additive manufacturing for tissue engineering," *Bioact. Compat. Polym.*, p. 21, 2019.
- [10] V. Lalzawmliana, A. Anand, P. Mukherjee, and S. Chaudhuri, "Marine organisms

- as a source of natural matrix for bone tissue engineering,” *Ceram. Int.*, vol. 45, pp. 1469–1481, 2019.
- [11] P. Chocholata, V. Kulda, and V. Babuska, “Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration,” *Materials*, p. 25, 2019.
- [12] P. Seeley, R. R., Stephens, T. D., & Tate, *Anatomia e Fisiologia*, 6th ed. 2003.
- [13] N. cancer institute seer training Modules, “Structure of Bone Tissue.” [Online]. Available: <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>.
- [14] O. S. University, “Bone Structure.” [Online]. Available: <https://open.oregonstate.education/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>.
- [15] L. J. Raggatt and N. C. Partridge, “Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 25103–25108, 2010.
- [16] P. A. de A. P. Marques, “Reacções de Superfície de Cerâmicos de Fosfato de Cálcio em Plasma Simulado,” 2003.
- [17] A. J. Festas, A. Ramos, and J. P. Davim, “Medical devices biomaterials – A review,” *J. Mater. Des. Appl.*, vol. 0, pp. 1–11, 2019.
- [18] J. W. C. Dunlop and P. Fratzl, “Multilevel architectures in natural materials,” *Scripta Materialia*, vol. 68, no. 1, pp. 8–12, 2013.
- [19] Y. He and F. Lu, “Development of Synthetic and Natural Materials for Tissue Engineering Applications Using Adipose Stem Cells,” *Stem Cells Int.*, vol. 2016, p. 12, 2016.
- [20] J. H. Choi *et al.*, “Adipose Tissue Engineering for Soft Tissue Regeneration,” *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 16, no. 4, pp. 413–426, 2010.
- [21] V. Desiderio *et al.*, “Human Ng2+ Adipose Stem Scaffold Fabricate a Skeletal Crosslinked Hyaluronic Acid-Lys Cells Loaded In Vivo on a New Muscle Tissue,” *J. Cell. Physiol.*, pp. 1762–1773, 2013.

- [22] S. Gomathysankar, A. S. Halim, and N. S. Yaacob, "Proliferation of Keratinocytes Induced by Adipose- Derived Stem Cells on a Chitosan Scaffold and Its Role in Wound Healing , a Review," *Arch. Plast. Surg.*, pp. 2–7, 2014.
- [23] J. Sun and H. Tan, "Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications," *Materials (Basel)*., vol. 6, pp. 1285–1309, 2013.
- [24] E. Martins, M. S. Rocha, T. H. Silva, and R. L. Reis, *Remarkable Body Architecture of Marine Sponges as Biomimetic Structure for Application in Tissue Engineering*, vol. 14. 2019.
- [25] A. Claudia, M. Renn, and R. N. Granito, "Natural marine sponges for bone tissue engineering : The state of art and future perspectives," *J. Biomed. Mater. Res.*, pp. 1717–1727, 2016.
- [26] J. N. A. Van Soest, R. W. M.; Boury-Esnault, N.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Erpenbeck, D.; De Voogd, N. J.; Santodomingo, N.; Vanhoorne, B.; Kelly, M.; Hooper, "Global Diversity of Sponges (Porifera)," *PLOS ONE*, p. 23, 2012.
- [27] E. Renard *et al.*, "Porifera (Sponges): Recent Knowledge and New Perspectives," *eLS*, p. 8, 2013.
- [28] J. Li and H. C. Schr, "The unique skeleton of siliceous sponges (Porifera ; Hexactinellida and Demospongiae) that evolved first from the Urmetazoa during the Proterozoic : a review," *Biogeosciences*, pp. 219–232, 2007.
- [29] J. C. Weaver, I. Pietrasanta, N. Hedin, B. F. Chmelka, P. K. Hansma, and D. E. Morse, "Nanostructural features of demosponge biosilica," *Struct. Biol.*, vol. 144, pp. 271–281, 2003.
- [30] Y. Wang *et al.*, "Progress and Applications of Polyphosphate in Bone and Cartilage Regeneration," *BioMed Research International*, vol. 2019, p. 12, 2019.
- [31] M. Sponge *et al.*, "Production, Characterization and Biocompatibility Evaluation of Collagen Membranes Derived from Marine Sponge *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847 Marina," *Marine Drugs*, p. 30, 2018.

- [32] M. O. Collagens and I. P. Applications, "Marine Origin Collagens and Its Potential Applications," *Marine Drugs*, pp. 5881–5901, 2014.
- [33] M. Schubert, B. Binnewerg, A. Voronkina, and L. Muzychka, "Naturally Prefabricated Marine Biomaterials : Isolation and Applications of Flat Chitinous 3D Scaffolds from *Ianthella labyrinthus* (Demospongiae : Verongiida)," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 1995, p. 19, 2019.
- [34] A. Carlos *et al.*, "Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos," *Química Nova*, vol. 33, pp. 1352–1358, 2010.
- [35] W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, and M. Bohner, "Calcium phosphates in biomedical applications : materials for the future ?," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 19, no. 2, pp. 69–87, 2016.
- [36] H. F. & K. M. & N. Mansouri, "Biomaterials , substitutes , and tissue engineering in bone repair : current and future concepts," *Comp. Clin. Path.*, pp. 879–891, 2019.
- [37] T. Albrektsson and C. Johansson, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration," *Eur. Spine J.*, pp. 96–101, 2001.
- [38] J. Lu, "Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review," *RSC Adv.*, pp. 2015–2033, 2018.
- [39] J. Jeong, J. H. Kim, J. H. Shim, N. S. Hwang, and C. Y. Heo, "Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration," *Biomater. Res.*, p. 11, 2019.
- [40] M. Vallet-regí and M. Vallet-regí, "Ceramics for medical applications," *J. Chem. Soc.*, pp. 97–108, 2001.
- [41] V. Olivier, N. Fauchoux, and P. Hardouin, "Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery," *Drug Discov. Today*, vol. 9, no. 18, pp. 803–811, 2004.

- [42] T. L. Arinzeh, T. Tran, J. Mcalary, and G. Daculsi, "A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation," *Biomaterials*, pp. 3631–3638, 2005.
- [43] P. Riches *et al.*, "Bioactive Materials 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering," *Bioact. Mater.*, vol. 3, pp. 278–314, 2017.
- [44] L. Roseti *et al.*, "Scaffolds for Bone Tissue Engineering : State of the art and new perspectives," *Mater. Sci. & Eng. C*, vol. 78, pp. 1246–1262, 2017.
- [45] P. V. and S. VM, "Bionanocomposite : A Review," *Austin J. Nanomedicine Nanotechnol.*, vol. 5, pp. 1–3, 2017.
- [46] S. Sathiyavimal, S. Vasantharaj, F. Lewisoscar, A. Pugazhendhi, and R. Subashkumar, "International Journal of Biological Macromolecules Biosynthesis and characterization of hydroxyapatite and its composite (hydroxyapatite-gelatin-chitosan- fi brin-bone ash) for bone tissue engineering applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 129, pp. 844–852, 2019.
- [47] and T. J. Tomasz Szatkowski , Katarzyna Siwinska-Stefanska , Marcin Wysokowski , Allison L. Stelling , Yvonne Joseph , Hermann Ehrlich, "Immobilization of Titanium (IV) Oxide onto 3D Spongin Scaffolds of Marine Sponge Origin According to Extreme Biomimetics Principles for," *Biomimetics*, p. 14, 2017.
- [48] A. A. Barros, I. M. Aroso, T. H. Silva, F. Mano, A. R. C. Duarte, and R. L. Reis, "Surface Modification of Silica-Based Marine Sponge Bioceramics Induce Hydroxyapatite Formation," *Cryst. Growth Des.*, pp. 4545–4552, 2014.
- [49] J. R. Parisi, K. R. Fernandes, I. R. Avanzi, B. P. Dorileo, A. F. Santana, and A. L. Andrade, "Incorporation of Collagen from Marine Sponges (Spongin) into Hydroxyapatite Samples : Characterization and In Vitro Biological Evaluation," *Mar. Biotechnol.*, p. 8, 2018.
- [50] K. Zhang *et al.*, "Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration," *Bone Res.*, p. 15, 2018.

- [51] J. P. Cattalini, J. Roether, A. Hoppe, F. Pishbin, and L. H. Durand, "Nanocomposite scaffolds with tunable mechanical and degradation capabilities: co-delivery of bioactive agents for bone tissue engineering," *Biomed. Mater.*, p. 14, 2016.
- [52] M. Dang, L. Saunders, X. Niu, Y. Fan, and P. X. Ma, "Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering," *Bone Res.*, p. 12, 2018.
- [53] C. T. J. A. J. Garcia, "Scaffold-based Anti-infection Strategies in Bone Repair," *Annu. Rev. of Biomed. Eng.*, p. 14, 2014.
- [54] G. Wei, Q. Jin, W. V Giannobile, and P. X. Ma, "The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres," *Biomaterials*, vol. 28, pp. 2087–2096, 2007.
- [55] M. Dang, A. J. Koh, X. Jin, L. K. Mccauley, and P. X. Ma, "Biomaterials Local pulsatile PTH delivery regenerates bone defects via enhanced bone remodeling in a cell-free scaffold," *Biomaterials*, vol. 114, p. 9, 2017.
- [56] Y. Gafni *et al.*, "Gene Therapy Platform for Bone Regeneration Using an Exogenously Regulated , AAV-2-Based Gene Expression System," *Mol. Ther.*, vol. 9, no. 4, pp. 587–595, 2004.
- [57] M. M. S. and J. H. George, "Exploring and Engineering the Cell Surface Interface," *Science (80-.)*, vol. 1135, p. 5, 2005.
- [58] K. Tas, "Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body Fluids," vol. 21, p. 10, 2000.
- [59] A. C. Tas and S. B. Bhaduri, "Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10× simulated body fluid," *J. Mater. Res.*, pp. 2742–2749, 2004.
- [60] B. D. Ratner, "Chapter I.1.5 - Surface Properties and Surface Characterization of Biomaterials," B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. B. T.-B. S. (Third E. Lemons, Eds. Academic Press, 2013, pp. 34–55.

- [61] A. F. Ismail, K. C. Khulbe, and T. Matsuura, "Chapter 3 - RO Membrane Characterization," A. F. Ismail, K. C. Khulbe, and T. B. T.-R. O. Matsuura, Eds. Elsevier, 2019, pp. 57–90.
- [62] W. Chrzanowski and F. Dehghani, "9 - Standardised chemical analysis and testing of biomaterials," in *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*, V. B. T.-S. in C. and T. E. Salih, Ed. Woodhead Publishing, 2013, pp. 166-197a.
- [63] A. Polini and F. Yang, "5 - Physicochemical characterization of nanofiber composites," M. Ramalingam and S. B. T.-N. C. for B. A. Ramakrishna, Eds. Woodhead Publishing, 2017, pp. 97–115.
- [64] A. du Plessis and C. Broeckhoven, "Looking deep into nature: A review of micro-computed tomography in biomimicry," *Acta Biomater.*, vol. 85, pp. 27–40, 2019.
- [65] H. E. 4 and T. J. 1 Małgorzata Norman 1, Przemysław Bartczak 1, Jakub Zdarta 1, Włodzimierz Tylus 2, Tomasz Szatkowski 1, Allison L. Stelling 3 and 1, "Adsorption of C.I. Natural Red 4 onto Spongin Skeleton of Marine Demosponge," *Materials (Basel)*., pp. 96–116, 2015.
- [66] J. Zdarta and H. Ehrlich, "Dyes and Pigments Anthocyanin dye conjugated with Hippospongia communis marine demosponge skeleton and its antiradical activity," vol. 134, pp. 541–552, 2016.
- [67] M. Canillas, P. Pena, A. H. De Aza, and M. A. Rodríguez, "Calcium phosphates for biomedical applications," *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.*, vol. 56, pp. 91–112, 2017.
- [68] M. S. M. Arsad, P. M. Lee, and U. T. Mara, "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles and β -TCP Particles," *IPCBE*, vol. 7, pp. 184–188, 2011.
- [69] A. Grunenwald *et al.*, "Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: a validated FTIR methodology," *J. Archaeol. Sci.*, p. 10, 2015.
- [70] A. L. Oliveira, S. A. Costa, R. A. Sousa, and R. L. Reis, "Nucleation and growth

- of biomimetic apatite layers on 3D plotted biodegradable polymeric scaffolds: Effect of static and dynamic coating conditions,” vol. 5, *Acta Materialia Inc.*, pp. 1626–1638, 2009.
- [71] J. S. (Eds. . Alexei Katashev, Yuri Dekhtyar, *Fourier Transform Infrared Spectra of Technologically Modified Calcium Phosphates Proceedings*. 2008.
- [72] P. Feng, Y. Deng, S. Duan, C. Gao, C. Shuai, and S. Peng, “Liquid Phase Sintered Ceramic Bone Scaffolds by Combined Laser and Furnace,” *Mol. Sci.*, vol. 15, pp. 14574–14590, 2014.
- [73] F. C. and H. F.-M. Cs. Gergely, P. Bar Yosef, R. Govrin-Lippman, “The deposition of calcium phosphates within polyelectrolyte multilayer films,” *Key Eng. Mater.*, vol. 242, pp. 287–290, 2003.
- [74] R. R. Costa, F. Mano, and R. R. Costa, “Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies,” *R. Soc. Chem.*, p. 27, 2014.
- [75] H. Massy-Beresford, “The cleaning power of sea sponges,” *The you research & Inoovation Magazine*. [Online]. Available: <https://horizon-magazine.eu/article/cleaning-power-sea-sponges.html>.
- [76] K. Y. L. and D. J. Mooney, “Alginate : properties and biomedical applications,” *Prog Polym Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126, 2013.
- [77] R. Chi, F. Cheung, T. B. Ng, J. H. Wong, and W. Y. Chan, “Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications,” *Mar. Drugs 2015*, pp. 5156–5186, 2015.
- [78] M. Bhavan and G. Nagar, “Chitosan-sodium alginate nanocomposites blended with cloisite 30b as a novel drug delivery system for anticancer drug curcumin,” *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*, vol. 2, pp. 402–411, 2011.
- [79] M. Hassanpour, H. Safardoust-hojaghan, and M. Salavati-niasari, “Degradation of methylene blue and Rhodamine B as water pollutants via green synthesized Co₃O₄ / ZnO nanocomposite,” *J. Mol. Liq.*, vol. 229, pp. 293–299, 2017.

- [80] E. Baldev, D. Mubarakali, A. Ilavarasi, D. Pandiaraj, K. A. S. Syed, and N. Thajuddin, "Degradation of synthetic dye, Rhodamine B to environmentally non-toxic products using microalgae," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier B.V., pp. 207–214, 2013.
- [81] A. C. Pradhan, A. Paul, and G. R. Rao, "Sol-gel- cum -hydrothermal synthesis of mesoporous Co-Fe @ Al₂O₃-MCM-41 for methylene blue remediation," *J. Chem. Sci.*, p. 16, 2017.
- [82] A. Lassoued, B. Dkhil, A. Gadri, and S. Ammar, "Control of the shape and size of iron oxide (α -Fe₂O₃) nanoparticles synthesized through the chemical precipitation method," *Results Phys.*, vol. 7, pp. 3007–3015, 2017.
- [83] "Bone." [Online]. Available:
https://en.wikipedia.org/wiki/Bone#/media/File:Bone_cross-section.svg.