



**Flávia Rosana Vieira  
Pinto**

**Citocompatibilidade de matrizes de quitosano/  
fosfato de cálcio**





**Flávia Rosana Vieira  
Pinto**

**Citocompatibilidade de matrizes de quitosano/  
fosfato de cálcio**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica das Doutoradas Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida e Maria Elizabete Jorge Vieira da Costa, Professoras Auxiliares do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e do Doutor Pedro de Sousa Gomes, Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.



À memória dos meus avós  
Maria Emília Soares e Francisco Caetano.



## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira**

Professor associado com agregação no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho**

Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida**

Professora auxiliar no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica



## **agradecimentos**

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Aos meus orientadores, a Prof. Dra. Margarida Almeida, a Prof. Dra. Elizabeth Costa e o Prof. Dr. Pedro Gomes pela forma como me orientaram e acompanharam neste trabalho, pela competência científica, disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes meses, assim como pelas críticas, correcções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À Prof. Dra. Maria Helena Fernandes do Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular por toda a disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos a nível do comportamento celular.

À Eng. Mónica do Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular por todo o apoio prestado com os ensaios celulares.

Ao Prof. José António e à Susana Pinto pela disponibilização e ajuda na medição dos ângulos de contacto e ao Nuno Carvalho pela incansável disponibilidade com o liofilizador.

À Cristina Mesquita por toda a ajuda inicial com o trabalho experimental.

A todos os técnicos do DEMaC por toda ajuda e disponibilidade prestada na caracterização das minhas amostras.

Aos meus colegas de laboratório pela maneira como me acolheram, pela ajuda e por todo o apoio.

Aos meus colegas do mestrado por estes dois anos de convivência, amizade e companheirismo.

A todos os meus amigos, em especial ao Guilherme por ter sido a chave de todo o incentivo, pela infinita ajuda, dedicação e paciência.

À minha irmã, por todo o carinho e amizade.

E, por fim, agradeço aos meus pais por me concederem mais uma realização pessoal e profissional, por todo o apoio, compreensão, paciência, carinho e amor demonstrado ao longo da minha vida.



## palavras-chave

Quitosano, Hidroxiapatite,  $\beta$ -TCP, Glutaraldeído, *Scaffolds*, Propriedades mecânicas, Molhabilidade, Rugosidade, Citocompatibilidade

## resumo

A concepção de estruturas adequadas para suportar o restauro ou melhorar a função de tecidos é um dos maiores desafios da engenharia de tecidos. Essas estruturas ou *scaffolds* são materiais porosos tridimensionais que servem de matrizes para a adesão e proliferação das células bem como para a produção de matriz extracelular à taxa a que decorre a degradação do *scaffold*.

Trabalhos anteriormente realizados no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica [15] estabeleceram as condições de preparação de *scaffolds* compósitos à base de quitosano reticulado com glutaraldeído (GA) combinado com grânulos de diferentes fosfatos de cálcio (hidroxiapatite (HAp),  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) ou misturas bifásicas) para aplicações em reparação óssea.

O presente estudo teve como objectivo avaliar o impacto das características dos *scaffolds* compósitos (porosidade, hidrofiliabilidade, rugosidade e propriedades mecânicas) na resposta celular (células MG-63). Para tal prepararam-se por atomização grânulos de HAp e de misturas bifásicas para posterior incorporação em *scaffolds* compósitos à base de quitosano reticulado. Todos os materiais produzidos foram caracterizados do ponto de vista estrutural, microestrutural e de comportamento mecânico. Prepararam-se também membranas com composição igual à dos *scaffolds* para avaliação da molhabilidade e da rugosidade. A resposta celular aos *scaffolds* preparados foi avaliada em termos de viabilidade, proliferação, adesão e morfologia celular bem como da actividade da fosfatase alcalina.

Os *scaffolds* compósitos obtidos são estruturas porosas, de poros interconectados e com tamanhos apropriados para regeneração de tecido ósseo. Observou-se uma melhoria significativa da resistência mecânica dos *scaffolds* com a reticulação, sobretudo após tratamento térmico à temperatura de 50°C, que indicia ser esta a temperatura óptima para reticulação. As medidas de ângulo de contacto e de rugosidade revelaram que as superfícies dos materiais compósitos em análise são maioritariamente hidrofóbicas e com rugosidades micrométricas, na gama dos 1,5-5,1 $\mu$ m. A resposta celular (linhagem celular MG-63) aos *scaffolds* compósitos, com grânulos de HAp ou bifásicos, evidenciou ser a concentração de glutaraldeído a variável com maior impacto na resposta biológica: 0.2% é a concentração de GA para a qual se registam os melhores níveis de adesão, proliferação e viabilidade celular. Embora as membranas compósitas com grânulos bifásicos tivessem evidenciado uma hidrofobicidade superior à das membranas com hidroxiapatite, tal diferença não se reflectiu significativamente no comportamento biológico dos *scaffolds* correspondentes. Apesar de evidenciarem melhores propriedades mecânicas, os *scaffolds* compósitos com elevado teor de reticulante (1%) apresentaram um pior desempenho biológico, confirmando ser a percentagem de reticulante o parâmetro que mais condiciona a resposta celular. Em conclusão, os *scaffolds* que induziram melhor resposta biológica foram os que apresentaram menor concentração de GA (0,2%) apresentando-se estes como as estruturas mais promissoras para aplicação em ET ósseo.



**keywords**

Chitosan, Hydroxyapatite,  $\beta$ -TCP, Glutaraldehyde, Scaffolds, Mechanical Properties, Wettability, Roughness, Citocompatibility

**abstract**

The design of appropriate structures to restore or to improve tissue function is a major challenge in tissue engineering. Such structures are three-dimensional scaffolds or porous materials that support cells adhesion, proliferation and production of extracellular matrix at a rate that ideally should match the scaffold degradation.

Previous studies at the Department of Materials and Ceramics Engineering [15] have established the conditions for the preparation of composite scaffolds based on chitosan crosslinked with glutaraldehyde (GA) combined with granules of different calcium phosphates (hydroxyapatite (HAp),  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) or biphasic mixtures) for applications in bone repair. The present study aimed to assess the impact of the characteristics of the composite scaffolds (porosity, hydrophilicity, roughness and mechanical properties) in the cellular response (MG-63 cells). For this purpose, granules of HAp or of biphasic mixtures were prepared by spray drying and subsequently incorporated into composites scaffolds based on crosslinked chitosan. All the produced materials were characterized in terms of structure, microstructure and mechanical behavior. Composite membranes with same composition as the scaffolds were also prepared for the evaluation of the wettability and surface roughness. The cellular response to the produced scaffolds was evaluated in terms of viability, proliferation, adhesion and cell morphology as well as alkaline phosphatase activity.

The obtained composite scaffolds are porous structures made of interconnected pores having suitable sizes for bone tissue regeneration. A significant improvement of the scaffolds mechanical strength was observed upon crosslinking, especially after heat treatment at a temperature of 50 °C, which indicates that this is the optimum temperature for crosslinking. Contact angle and surface roughness measurements showed that the composite materials under analysis are mostly hydrophobic and with a micrometric roughness in the range of 1.5- 5.1 $\mu$ m. The cellular response (MG-63 cell line) to composite scaffolds with HAp or biphasic granules evidenced that GA concentration is the variable with the greatest impact on the biological response: 0.2 % is the concentration of GA to which correspond the best levels of cell adhesion, proliferation and viability. Although the composite membranes with biphasic granules have shown a higher hydrophobicity than membranes with hydroxyapatite, such difference is not significantly reflected by the biological behavior of the corresponding scaffolds. While evidencing better mechanical properties, composites scaffolds with high content of crosslinker (1%) showed a worse biological performance confirming the percentage of crosslinking as the parameter that most influences the cellular response. In conclusion, the scaffolds that induce the better biological performance were those having low concentration of GA (0.2 %), being these the most promising structures for application in bone tissue engineering.



# Índice

Índice de Tabelas .....	vii
Abreviaturas .....	ix
Capítulo 1.....	1
1. Introdução .....	3
1.1. Objectivos .....	5
1.2. Estrutura da tese.....	5
Capítulo 2.....	7
2. Revisão da Literatura .....	9
2.1. Tecido ósseo – Estrutura e Propriedades .....	9
2.2. Engenharia de tecidos aplicada ao tecido ósseo .....	14
2.2.1. <i>Scaffolds</i> para engenharia de tecidos ósseos .....	15
2.2.2. Materiais.....	16
2.3. Resposta celular à superfície e arquitectura dos scaffolds .....	20
2.3.1. Adsorção de proteínas.....	21
2.3.2. Molhabilidade .....	22
2.3.3. Carga e energia de superfície .....	25
2.3.4. Rigidez .....	26
2.3.5. Rugosidade.....	28
2.3.6. Porosidade e tamanho dos poros .....	30
2.4. Testes de Biocompatibilidade.....	32
2.4.1. Sistemas de testes estabelecidos.....	32
2.4.2. Testes <i>in vitro</i> para avaliação da biocompatibilidade .....	33
Capítulo 3.....	39
3. Procedimento Experimental.....	41
3.1. Materiais e células.....	41
3.2. Métodos de Preparação .....	41
3.2.1. Preparação dos grânulos de CaP.....	41
3.2.2. Preparação das matrizes de CH reticuladas e dos <i>scaffolds</i> compósitos.....	42
3.2.3. Preparação das membranas compósitas .....	44
3.3. Caracterização .....	45

3.3.1. Caracterização dos grânulos de CaP.....	45
3.3.2. Caracterização dos scaffolds .....	45
3.3.3. Caracterização das membranas compósitas .....	48
3.4. Estudos de citocompatibilidade dos <i>scaffolds</i> .....	49
3.4.1. Estabelecimento e manutenção das culturas celulares .....	50
3.4.2. Caracterização das culturas celulares .....	50
3.4.2.1. Viabilidade/proliferação celular (Resazurina) .....	50
3.4.2.2. Actividade da Fosfatase Alcalina.....	51
3.4.2.3. Avaliação da adesão e morfologia celular por microscopia electrónica de varrimento (SEM).....	52
3.4.2.4. Análise estatística .....	52
Capítulo 4.....	53
4. Resultados e Discussão.....	55
4.1 Caracterização dos grânulos de CaP.....	55
4.2. Caracterização das matrizes de CH reticuladas.....	60
4.3 Caracterização das membranas compósitas .....	73
4.3.1 Rugosidade .....	74
4.3.2 Molhabilidade .....	78
4.4 Caracterização dos scaffolds compósitos.....	83
4.3. Citocompatibilidade dos <i>scaffolds</i> compósitos.....	90
Capítulo 5.....	95
5. Conclusões e Futuros Desenvolvimentos .....	97
Referências .....	100

## Índice de Imagens

Figura 1- Secção do fémur, mostrando o osso cortical e osso esponjoso. Micrografias do osso esponjoso e do osso cortical, onde é visível a estrutura trabecular e cortical, respectivamente. ....	10
Figura 2 - Representação esquemática do processo de remodelação óssea. ....	13
Figura 3 – Representação esquemática das três estratégias principais da engenharia de tecidos que podem ser usadas para regenerar defeitos nos tecidos ósseos.....	15
Figura 4 – Ilustração da reticulação da molécula de quitosano pelo glutaraldeído .....	19
Figura 5 - Ilustração da ligação das células à superfície do material.....	22
Figura 6 - Ângulo de contacto, $\theta$ , para (a) superfícies hidrofóbicas e (b) superfícies hidrofílicas. ....	23
Figura 7 - Micrografias SEM da adesão celular de fibroblastos em superfícies de PE após 1 e 2 dias de cultura com diferentes ângulos de contacto (magnificação original x400)...	24
Figura 8 - As densidades de carga positiva em hidrogéis HEMA suportam uma melhor fixação e espalhamento celular em relação às cargas negativas e neutra. ....	26
Figura 9 – Ilustrações que descrevem a ligação de uma célula a substratos frágeis e rígidos.....	27
Figura 10 - Sequência temporal dos processos associados à resposta celular face à rigidez do substrato. As células sondam continuamente as propriedades mecânicas do seu substrato, induzindo a sinais que têm rapidamente impacto na organização do citoesqueleto e na matriz. Estas alterações induzem distintas respostas numa vasta gama de funções celulares. ....	28
Figura 11 - Scaffolds com diferentes tipos de porosidades .....	30
Figura 12 – Conversão da resazurina a resofurina por células viáveis, resultando num produto fluorescente. A fluorescência produzida é proporcional ao número de células viáveis .....	34
Figura 13 - Ensaio colorimétrico – MTT .....	34
Figura 14 - Exemplos de imagens de microscopia de fluorescência (A,B) e de microscopia electrónica de varrimento (C,D) de células MG63.....	35
Figura 15 - Representação esquemática de um ciclo da técnica de PCR. ....	36
Figura 16 – Atomizador laboratorial Mini <i>Spray Dryer</i> Bushi-191 e respectivas condições de utilização.....	42
Figura 17 – Moldes cilíndricos utilizados no fabrico dos <i>scaffolds</i> .....	43
Figura 18 - Liofilizador Labconco freeze DrySystem. ....	44

Figura 19 - Cálculo da área dos poros usando o <i>ImageJ</i> 1.45. ....	46
Figura 20 - Cálculo do tamanho médio dos poros usando o <i>ImageJ</i> 1.45. ....	46
Figura 21 - Equipamento de ensaios mecânicos Zwick/Roell Z020 e respectiva célula de carga utilizada. ....	47
Figura 22 - Perfilómetro (Perthometer M1, Mahr) utilizado nas medições de rugosidade das membranas. ....	48
Figura 23 - Aparelho de medição de ângulos de contacto Dataphysics – <i>contact angle system</i> OCA. ....	49
Figura 24 - Imagens SEM de HAp: a) partículas da suspensão inicial de HAp e b) grânulos de HAp atomizados. ....	55
Figura 25 - Imagens SEM de $\beta$ -TCP: a) partículas da suspensão inicial de $\beta$ -TCP e b) grânulos de $\beta$ -TCP atomizados. ....	56
Figura 26 - Imagens SEM de misturas bifásicas: a) e c) partículas da suspensão bifásica inicial e b) e d) grânulos bifásicos atomizados. ....	56
Figura 27 - Difractograma de raio-X dos grânulos de HAp, $\beta$ -TCP e dos grânulos Bifásicos, obtidos por atomização. ....	58
Figura 28 - Micrografias de SEM dos grânulos: a), c), e) e g) de HAp e b), d), f) e h) bifásicos. ....	59
Figura 29 - Micrografias de SEM de scaffolds de CH. ....	61
Figura 30 - - Micrografias de SEM dos scaffolds de quitosano com a adição de diferentes teores de glutaraldeído e respectivos valores para o tamanho médio de poro: 0,2% (a, b); 0,5% (c, d); 1% (e, f); 5% (g, h) e 10%(i, j). ....	62
Figura 31 - Comportamento mecânico dos scaffolds de quitosano com a adição de diferentes percentagens de glutaraldeído. ....	63
Figura 32 – Actividade metabólica das culturas estabelecidas nos diferentes <i>scaffolds</i> de quitosano sem e com as diferentes percentagens de GA, ensaio da resazurina. ....	65
Figura 33 – Imagens de SEM das culturas celulares estabelecidas nos diferentes <i>scaffolds</i> em estudo. ....	67
Figura 34 - Ilustração do processo de interacção célula/substrato: adesão, espalhamento e proliferação e imagem SEM que ilustra a morfologia típica das células MG-63. ....	68
Figura 35 - Micrografias obtidas por SEM dos scaffolds de quitosano com 0,5% de GA sem tratamento e submetidos a tratamento térmico de 40°, 50° e 60°. ....	69
Figura 36 - Distribuição do tamanho de poros dos <i>scaffolds</i> de quitosano com 0,5% de GA após tratamento térmico de 40°C, 50°C e 60°C. ....	70

Figura 37 - Comportamento mecânico dos scaffolds de quitosano com 0.5% de GA submetidos a tratamento térmico de 40°, 50° e 60°.	71
Figura 38 - Micrografia obtida por SEM da membrana de quitosano.	75
Figura 39 – Imagens de SEM da secção transversal das membranas de quitosano com (a) 0.2%GA e (b) 0,5%GA. A imagem (c) representa a superfície da membrana de CH+0,5%GA.	76
Figura 40 - Imagens SEM da superfície e da secção transversal das membranas de quitosano com grânulos bifásicos (a) e (c) e de HAp (b) e (d). As imagens (e) e (f) correspondem a um pormenor de um aglomerado da membrana de HAp.	77
Figura 41 - Curvas tendência das medições do ângulo de contacto ao longo do tempo para as diferentes membranas.	82
Figura 42 - Micrografias obtidas por SEM dos <i>scaffolds</i> de HAp com: a), b), c) 0,2% de GA, d), e), f) 0,5% de GA, g) h), i) 1% de GA e j), k), l) com tratamento térmico, com os respectivos valores do tamanho médio de poro.	84
Figura 43 - Comportamento mecânico dos diferentes scaffolds de HAp.	85
Figura 44 - Micrografias obtidas por SEM dos <i>scaffolds</i> bifásicos com: a), b), c) 0,2% de GA, d), e), f) 0,5% de GA, g) h), i) 1% de GA e j), k), l) com tratamento térmico, com os respectivos valores médios para o tamanho de poro.	87
Figura 45 - Comportamento mecânico dos diferentes <i>scaffolds</i> bifásicos.	88
Figura 46 - Comportamento dos diferentes <i>scaffolds</i> de HAp e bifásicos face à presença de células através do ensaio de viabilidade celular - resazurina.	90
Figura 47 - Actividade da fosfatase alcalina das culturas estabelecidas nos diferentes <i>scaffolds</i> de HAp e bifásicos.	91
Figura 48 - Imagens SEM da cultura celular presente nos <i>scaffolds</i> de HAp com 0,2%GA ao final de 1 dia de experiência.	92
Figura 49 - Imagens SEM da cultura celular presente nos scaffolds bifásicos com 0,2%GA ao final de 1 dia (a, b) e 7 dias (c, d) de experiência.	93



## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Diferenças entre o osso cortical e trabecular. ....	11
Tabela 2 - Tipos de células ósseas e respectivas funções.....	11
Tabela 3 - Requisitos para um scaffold ideal para engenharia de tecido ósseo. ....	16
Tabela 4 - Principais variáveis que podem influenciar a resposta do hospedeiro.....	21
Tabela 5 – Tamanho(s) do(s) poro(s) desejados em <i>scaffolds</i> destinados a diferentes tipos de células. ....	31
Tabela 6 - Áreas superficiais específicas obtidas por BET das diferentes partículas antes e depois de atomizadas (grânulos). ....	57
Tabela 7 - Módulos de Young dos <i>scaffolds</i> de quitosano com os diferentes teores de GA. ....	64
Tabela 8 - Módulos de Young dos diferentes <i>scaffolds</i> tratados termicamente. ....	71
Tabela 9 – Composição das membranas e respectiva designação.....	73
Tabela 10- Valores médios das medições das rugosidades, Ra, das diferentes membranas.....	74
Tabela 11 - Ângulo de contacto médio medido das diferentes membranas. ....	79
Tabela 12 - Descrição dos <i>scaffolds</i> e dos materiais utilizados no respectivo fabrico. ....	83
Tabela 13 - Módulos de Young dos diferentes <i>scaffolds</i> de HAp. ....	86
Tabela 14 - Módulos de Young dos diferentes <i>scaffolds</i> com grânulos bifásicos. ....	88
Tabela 15 - Quadro resumo de todos os resultados obtidos na caracterização dos <i>scaffolds</i> e das membranas compósitos(as). ....	94



## Abreviaturas

**3D** – Tridimensional

**ALP** – Fosfatase alcalina

**BET** - modelo de Brunauer, Emmet e Teller

**BMPs** - Proteínas morfogenéticas ósseas

**CaP** – Fosfatos de Cálcio

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**CH** - Quitosano

**DRX** - Difraccção de raio-X

**ET** - Engenharia de Tecidos

**ETO** – Engenharia de tecido ósseo

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**FGFs** - Factores de crescimento fibroblásticos

**GA** - Glutaraldeído

**HAp** - Hidroxiapatite

**HCA** - Hidroxiapatite carbonatada

**ISO** - International Standard Organization

**LDH** – Desidrogenase do lactato

**MEC** – Matriz extra celular

**OBLs** - Osteoblastos

**OCL** - Osteoclasto

**OECD** - *Organization for Economic Cooperation and Development*

**PA** – Poliacrilamida

**PCR** – Reacção em cadeia da polimerase

**PGA** – Ácido poliglicólico

**PLA** – Ácido polilático

**PLGA** - Poli(ácido láctico-co-glicólico)

**PTH** – Hormona da paratiróide

**SEM** - Microscopia electrónica de varrimento

**TGFβ** - Factores transformadores de crescimento β

**UV** – Ultravioleta

**β-TCP** - β-fosfato tricálcico



# Capítulo 1

---

## Introdução e Objectivos



## 1. Introdução

O osso é um tecido dinâmico altamente vascularizado e que desempenha diversas funções essenciais ao equilíbrio vital: fornece o apoio estrutural ao corpo, serve de reservatório mineral, apoia a contração muscular e protege os órgãos internos. Quando se verificam grandes danos na sua estrutura, devido a lesão ou doença, dá-se uma alteração drástica do equilíbrio fisiológico deste tecido e do próprio organismo, que pode afectar a qualidade de vida [1].

Ao longo dos últimos anos, embora se tenham registado importantes avanços no campo da medicina regenerativa do tecido ósseo, as terapias actuais, como o recurso aos enxertos ósseos, ainda apresentam várias limitações. Além disso, e apesar da ciência e engenharia dos materiais ter vindo a proporcionar excelentes resultados no desenvolvimento de substitutos sintéticos, nenhum substituto ósseo apresenta ainda propriedades ideais para a generalidade das aplicações clínicas. Assim, a maioria das lesões graves relacionadas com o osso são ainda irrecuperáveis ou tratadas de forma limitada [1].

É neste contexto que surge a engenharia de tecidos (ET), fundamentalmente descrita como um novo domínio multidisciplinar que tem como objectivo desenvolver substitutos biológicos capazes de restaurar, substituir ou regenerar a forma e função dos tecidos. As células, os *scaffolds* e factores de crescimento são os principais componentes da ET. Os *scaffolds* servem como estruturas de suporte temporário, proporcionando não só o suporte tridimensional para o crescimento de tecido e sua formação adequada mas também um ambiente biológico favorável para o crescimento e diferenciação das células [2, 3].

Aos materiais usados para fabrico de *scaffolds* exigem-se assim propriedades adequadas para obtenção das matrizes com os requisitos atrás referidos. Neste contexto, soluções que combinem polímeros naturais, biocompatíveis e biodegradáveis com materiais cerâmicos, bioactivos, e com composição semelhante à do componente mineral do osso, são um ponto de partida promissor face a outros materiais.

Nos últimos 40 anos observou-se o desenvolvimento de uma variedade espantosa de biomateriais para a fabricação de *scaffolds* “ideais” para o crescimento e diferenciação celular, embora poucos se tenham revelado clinicamente relevantes. Os biomateriais, permanentes ou biodegradáveis, naturais ou sintéticos, têm de ser biocompatíveis, de preferência osteoindutores, osteocondutores e mecanicamente compatíveis com o osso nativo, para cumprirem a função desejada. Do mesmo modo, devem apresentar outras

características relevantes, tais como: propriedades de superfície adequadas (rugosidade, molhabilidade, energia e carga de superfície), estrutura de poros propensa às várias interacções celulares e à angiogénese, biodegradabilidade, facilidade de fabrico através de técnicas de processamento apropriadas para adequar o *scaffold* às características geométricas do defeito ósseo e, por fim, serem esterilizáveis. Todos estes requisitos são importantes pois têm influência não só na sobrevivência, sinalização, adesão, proliferação e reorganização das células, mas também na sua expressão de genes e preservação/desenvolvimento do seu fenótipo (diferenciação) [4-6].

Os materiais destinados à produção de *scaffolds* devem idealmente imitar a estrutura e as funções biológicas do osso nativo, tanto em termos da composição química como das propriedades físicas [3].

O uso de materiais compósitos de polímero/cerâmico é, numa perspectiva biológica, uma estratégia natural, uma vez que o osso nativo é também uma combinação natural entre um polímero (colagénio) e apatite biológica. Por outro lado, um *scaffold* de polímero (natural e biocompatível) e fosfato de cálcio poderá combinar as vantagens de ambos os materiais de modo a atender às exigências mecânicas e fisiológicas do tecido ósseo, ou seja, apresentando comportamento semelhante ao do osso, em matéria de deformação e resistência à fractura e obviando problemas de biocompatibilidade associados à utilização de polímeros puros, nomeadamente à toxicidade dos seus produtos de degradação [7, 8].

Um material é definido como biocompatível se não induzir resposta inflamatória, não for imunogénico e não for citotóxico para as células e os tecidos. A biocompatibilidade é uma característica que o material deve ter aquando da sua implantação mas também durante a sua vida útil como implante, ou seja, os produtos da sua degradação também devem ser biocompatíveis [4].

As respostas celulares variam significativamente consoante as características químicas, físicas e biomecânicas do *scaffold*, tanto a nível da superfície, como é o caso das cargas e energia livre de superfície, molhabilidade e rugosidade, como a nível da arquitectura do *scaffold* traduzida na porosidade, tamanho e distribuição de tamanho de poro e sua interconectividade que condiciona essencialmente as suas propriedades mecânicas (a rigidez por exemplo). Dependendo do tipo de células, estas podem preferir substratos mais ou menos rígidos. A porosidade do *scaffold*, o tamanho dos poros, a sua morfologia e interconectividade são propriedades essenciais para uma boa adesão e proliferação celulares e, conseqüentemente para a formação de um novo tecido a três dimensões. Os *scaffolds* para aplicações no tecido ósseo devem mimetizar a morfologia, estrutura e função do osso, a fim de otimizar a integração no tecido circundante [3, 9, 10].

Na caracterização de um biomaterial para aplicação em ETO, a biocompatibilidade deve ser testada preferencialmente *in vitro* antes de ser avaliada *in vivo*. A compatibilidade *in vitro* pode ser testada por uma via directa, expondo a superfície do material ao contacto com as células ou, por uma via indirecta em que as células contactam com produtos derivados do material ou usando uma camada interposta entre as células e os materiais. É assim possível, através destes testes, estudar a viabilidade celular/proliferação, a adesão e morfologia celular e a sua funcionalidade, obtendo uma informação rápida que permite descartar materiais não biocompatíveis numa fase prévia aos testes *in vivo* [11-14].

## 1.1. Objectivos

Trabalhos anteriores desenvolvidos da Universidade de Aveiro [15] estabeleceram as condições apropriadas para produção de matrizes compósitas de polímero (quitosano) e fosfato de cálcio com características promissoras para a engenharia de tecido ósseo (ETO). A resposta celular às referidas matrizes não foi porém ainda estudada, desconhecendo-se assim a forma como diversos parâmetros, designadamente a composição, a microestrutura (morfologia, propriedades mecânicas) e as propriedades de superfície (rugosidade e molhabilidade) condicionam a interacção *scaffold*/células. O objectivo da presente tese centra-se pois no estudo *in vitro* da biocompatibilidade de *scaffolds* para ETO. As matrizes combinarão um polímero natural, o quitosano reticulado (com Glutaraldeído), com diferentes fostatos de cálcio, designadamente a hidroxiapatite (HAp), o  $\beta$ -TCP e misturas bifásicas de ambos (HAp e  $\beta$ -TCP). Pretende-se correlacionar a resposta celular suscitada com as propriedades de superfície e arquitectura de *scaffolds* por forma a otimizar a biocompatibilidade das estruturas compósitas em análise.

## 1.2. Estrutura da tese

A presente tese está organizada em cinco capítulos. O capítulo 1 introduz o tema da tese e apresenta os objectivos que presidem ao presente trabalho bem como a estrutura da mesma. No capítulo 2 é feita uma revisão da bibliografia para a contextualização e para um melhor entendimento deste trabalho. No capítulo 3 está descrito detalhadamente todo o procedimento experimental, bem como as técnicas de caracterização utilizadas. O capítulo 4 apresenta todos os resultados experimentais

obtidos, focando-se na sua análise e discussão. Por fim, no capítulo 5, intitulado “Conclusão e futuros desenvolvimentos”, é feita uma síntese do trabalho realizado e apresentam-se algumas sugestões/recomendações para trabalho futuro.

# Capítulo 2

---

## Revisão da Literatura



## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Tecido ósseo – Estrutura e Propriedades

O osso é um tecido conjuntivo constituído por uma matriz orgânica mineralizada com células vivas (população heterogénea de condrócitos, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, células endoteliais, monócitos, macrófagos, linfócitos e células hematopoiéticas) incorporadas, que proporciona ao indivíduo o suporte mecânico ao movimento e a protecção dos seus órgãos vitais. Além disso, o osso é um reservatório de muitos minerais essenciais e desempenha um papel importante na regulação das concentrações de iões no fluido extracelular [16-18].

Do ponto de vista composicional, a parte mineral compreende 50% a 70% do osso adulto, a matriz orgânica cerca de 20% a 40%, possuindo ainda água (cerca de 5 a 10%) e lípidos (1 a 5%) na sua composição. Cerca de 90% da matriz orgânica do osso é composta por colagénio do tipo I. A parte mineral óssea é composta principalmente por cristais de hidroxiapatite (HAp), responsáveis pela rigidez e resistência mecânica. A percentagem de minerais no osso aumenta com a idade do indivíduo, ao mesmo tempo que diminui a quantidade de matriz orgânica, o que explica que os ossos de indivíduos jovens sejam mais resistentes e os dos indivíduos mais velhos, mais frágeis [19].

A um nível macroscópico, os ossos compõe-se de dois tipos de tecido: osso cortical ou compacto e osso esponjoso ou trabecular (Figura 1). O osso cortical está localizado na parede exterior, sendo principalmente encontrado na diáfise dos ossos longos. Apresenta uma grande dureza e elevada densidade e, conseqüentemente, uma baixa porosidade (cerca de 10%). Organiza-se em forma de finas lâminas concêntricas alinhadas na direcção longitudinal do osso, que fazem parte dos denominados sistemas heversianos (ou *osteons*). O osso cortical representa quase 80% da massa óssea. Tem uma taxa de remodelação lenta (cujo valor anual é de cerca de 3%) e uma alta resistência à flexão e à torção [18-20].

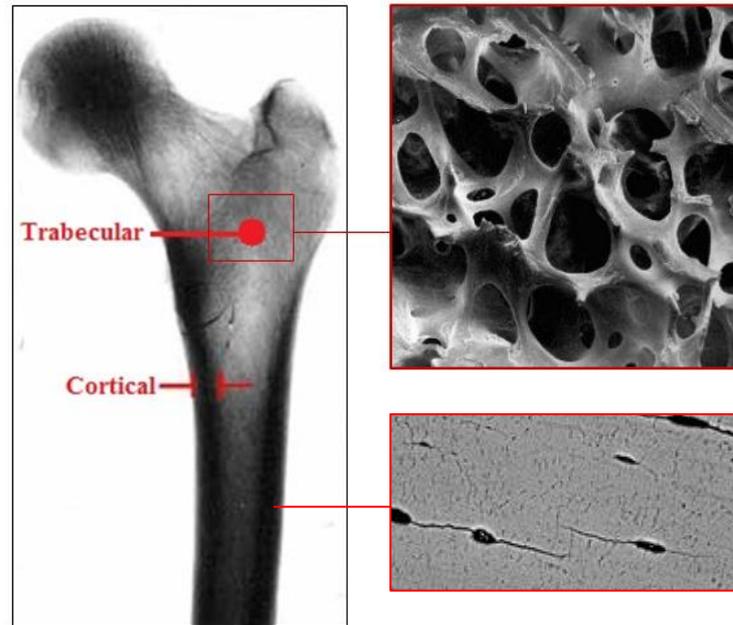


Figura 1- Secção do fêmur, mostrando o osso cortical e osso esponjoso. Micrografias do osso esponjoso e do osso cortical, onde é visível a estrutura trabecular e cortical, respectivamente.

O osso trabecular encontra-se nas metáfises e epífises dos ossos longos e na parte interior dos ossos não regulares. É constituído por uma rede de trabéculas ósseas interligadas com os espaços preenchidos com medula óssea e vasos, proporcionando comparativamente com o osso cortical, um suporte mecânico menor. O osso trabecular é menos denso, menos rígido e mais elástico do que o osso cortical. Devido à sua estrutura trabecular, o osso esponjoso resiste bem a cargas compressivas. Este tipo de osso representa apenas 20% da massa óssea, sendo esta uma das razões para a sua remodelação mais rápida, cuja taxa de anual é de 25%. A maior dinâmica de remodelação óssea pode explicar a menor rigidez deste tipo de osso devido ao facto de o seu período de maturação ser mais curto relativamente ao osso cortical [18-20].

As propriedades mecânicas do osso vão variar com o paciente (i.e., idade, género, condição sistémica), a sua localização anatómica, com a direcção da carga aplicada (longitudinal, transversal) e com a velocidade de aplicação desta, bem como com o tipo de carga (compressão, tracção ou corte). O osso é um material não homogéneo devido ao facto de ser constituído por várias substâncias orgânicas e inorgânicas, com diferentes propriedades mecânicas. Estes factos justificam a diversidade de valores das propriedades mecânicas encontrados na literatura [19].

A maior resistência do osso observa-se essencialmente ao longo do seu eixo, que é aproximadamente paralelo ao eixo das fibras de colagénio e dos cristais minerais.

Embora sejam aparentemente rígidos, os ossos exibem um grau considerável de elasticidade que é importante na capacidade do esqueleto suportar impactos [17].

Na Tabela 1 estão caracterizadas as principais diferenças entre o osso cortical e trabecular.

**Tabela 1 - Diferenças entre o osso cortical e trabecular. Adaptado de: [21-25].**

	Osso cortical	Osso trabecular
Superfície / Volume de osso (mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> )	2,5	20
Volume total de osso	80%	20%
Superfície interna total (mm <sup>2</sup> )	33%	67%
Função	Maioritariamente biomecânica, mas também serve de suporte e proteção.	Maioritariamente homeostase mineral, mas também ajuda no suporte.
Porosidade	Baixa (5 a 10%)	Alta (75 a 90%)
Módulo de elasticidade (GPa)	17	0,1 a 2
Módulo de rigidez (GPa)	8,7-14,1	0,02-0,5
Resistência à compressão (MPa)	131-224	2-12
Resistência à flexão (MPa)	135-193	-
Resistência à tração (MPa)	50-151	1-5

A síntese, manutenção e reabsorção do tecido ósseo resultam da interação de três tipos de células: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Todas elas têm tarefas definidas e são, portanto, essenciais para a manutenção de um tecido ósseo saudável [1]. As suas características e funções estão sumarizadas na Tabela 2.

**Tabela 2 - Tipos de células ósseas e respectivas funções. Adaptado de: [1].**

Tipo de célula	Características morfológicas	Função
<b>Osteoblastos</b>	Forma cúbica, polarizada e localizada - Os seus precursores organizam-se na superfície do osso, onde formam uma camada estreita de células.	Síntese e regulação da deposição e mineralização da MEC óssea;
<b>Osteócitos</b>	Em forma de estrela; Possuem menos organelos que os osteoblastos.	Homeostase mineral
<b>Osteoclastos</b>	Células polarizadas e multinucleadas.	Reabsorção óssea.

Ao longo da vida, a remodelação fisiológica, remoção e substituição óssea ocorrem sem afectar a forma ou a densidade do osso, através de uma sequência de eventos ou fases, que incluem (i) a fase de activação dos osteoclastos, (ii) a fase de reabsorção de osso, (iii) fase reversa e a (iv) fase de formação de osso novo no local de reabsorção [17]. Estas fases são discutidas seguidamente e apresentadas esquematicamente na Figura 2.

**Fase de activação** – Esta primeira fase envolve a detecção de um sinal que pode assumir diversas formas como por exemplo uma tensão mecânica directa sobre o osso que resulta em danos estruturais ou uma acção hormonal sobre as células ósseas (por ex. estrogénio, hormona paratiroideia (PTH)) em resposta a alterações na homeostase. Na presença de qualquer destes sinais, as células de revestimento aumentam a expressão de RANKL (Receptor Activador do ligante nuclear kB) à superfície, que por sua vez interage com o seu receptor RANK (Receptor activador nuclear kB), expresso pelos pré-osteoclastos. Esta interacção leva à activação, diferenciação e fusão dos osteoclastos, iniciando-se o processo de reabsorção.

**Fase de reabsorção** - Uma vez diferenciados, os osteoclastos polarizam e aderem à superfície do osso, começando a dissolvê-lo através da libertação de enzimas (responsáveis pela degradação da componente orgânica da MEC) e secreções ácidas (responsáveis pela degradação da componente mineral da MEC).

**Fase reversa** – Preparação da superfície do osso para a formação óssea, havendo a remoção dos detritos produzidos durante a degradação da matriz.

**Fase de formação** – A reabsorção da matriz óssea leva à libertação de vários factores de crescimento armazenados na matriz, responsáveis pelo recrutamento de osteoblastos e seus precursores na área reabsorvida. Estes produzem a nova matriz óssea, inicialmente não calcificada (osteóide) e, em seguida, provem a mineralização, completando assim o processo de remodelação óssea [26-28].

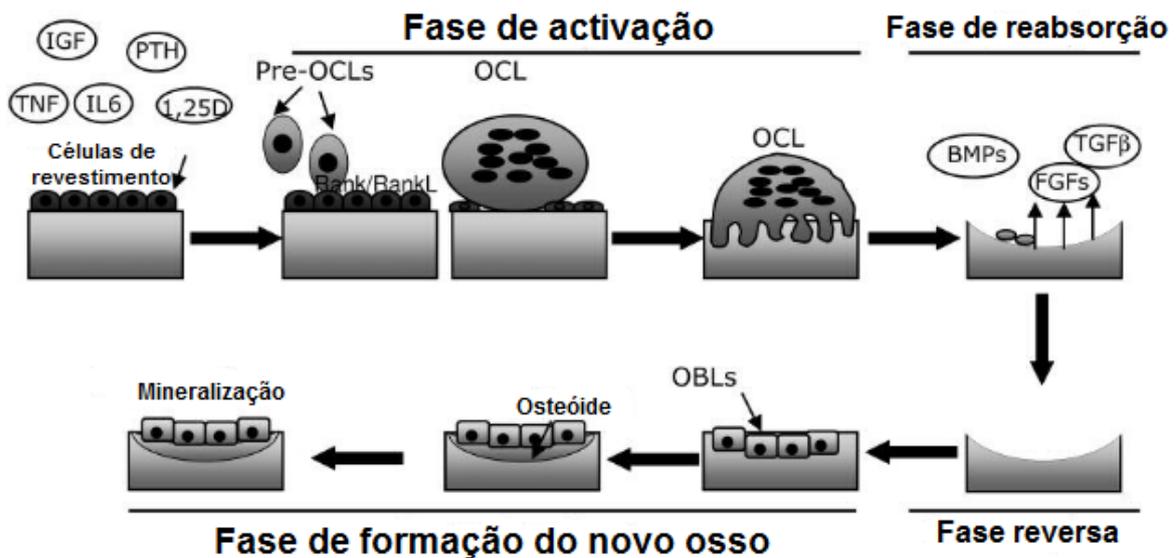


Figura 2 - Representação esquemática do processo de remodelação óssea. A remodelação óssea começa quando diferentes factores levam à activação de células de revestimento, o que aumenta a expressão de superfície de RANKL. RANKL interage com o seu receptor RANK desencadeando assim a diferenciação dos osteoclastos (Fase de Activação). Os osteoclastos reabsorvem o osso (Fase de Reabsorção), permitindo assim a libertação de factores normalmente armazenados na matriz óssea (e.g., proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), factores transformadores de crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ), factores de crescimento fibroblásticos (FGFs)) que recrutam os osteoblastos na área reabsorvida. Dá-se então a produção da nova matriz óssea e consequente mineralização por parte dos osteoblastos (Fase de Formação), completando assim o processo de remodelação. (pre-OCLs= pré-osteoclastos; OCL= osteoclastos; OBLs= osteoblastos). Adaptado de: [26].

Havendo um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação do novo osso, é de esperar uma remodelação óssea incorrecta, que por sua vez afecta a massa óssea, levando a uma condição patológica, como por exemplo osteopenia (diminuição da densidade mineral óssea, que frequentemente antecede o estado patológico de osteoporose), osteoporose (condição patológica caracterizada pela diminuição da massa e densidade do tecido ósseo) e a osteopetrose (condição patológica caracterizada pelo aumento anormal da densidade óssea) [26, 29].

Além disso, existem outras condições em cirurgia ortopédica nas quais é necessária a regeneração do osso em grande quantidade (para além do potencial normal de auto-regeneração) que pode complicar a osteossíntese e levar à não-união da fractura, como é o caso, por exemplo, da reconstrução de grandes defeitos ósseos criados por trauma, infecção, ressecções tumorais ou anormalidades esqueléticas [30].

Para todos estes casos, em que o processo fisiológico de regeneração é insuficiente, é necessário recorrer a metodologias que ajudem à regeneração, entre as quais a engenharia de tecido ósseo, que pode trazer a solução definitiva e esperança para muitos pacientes que sofrem desses problemas [31].

## 2.2. Engenharia de tecidos aplicada ao tecido ósseo

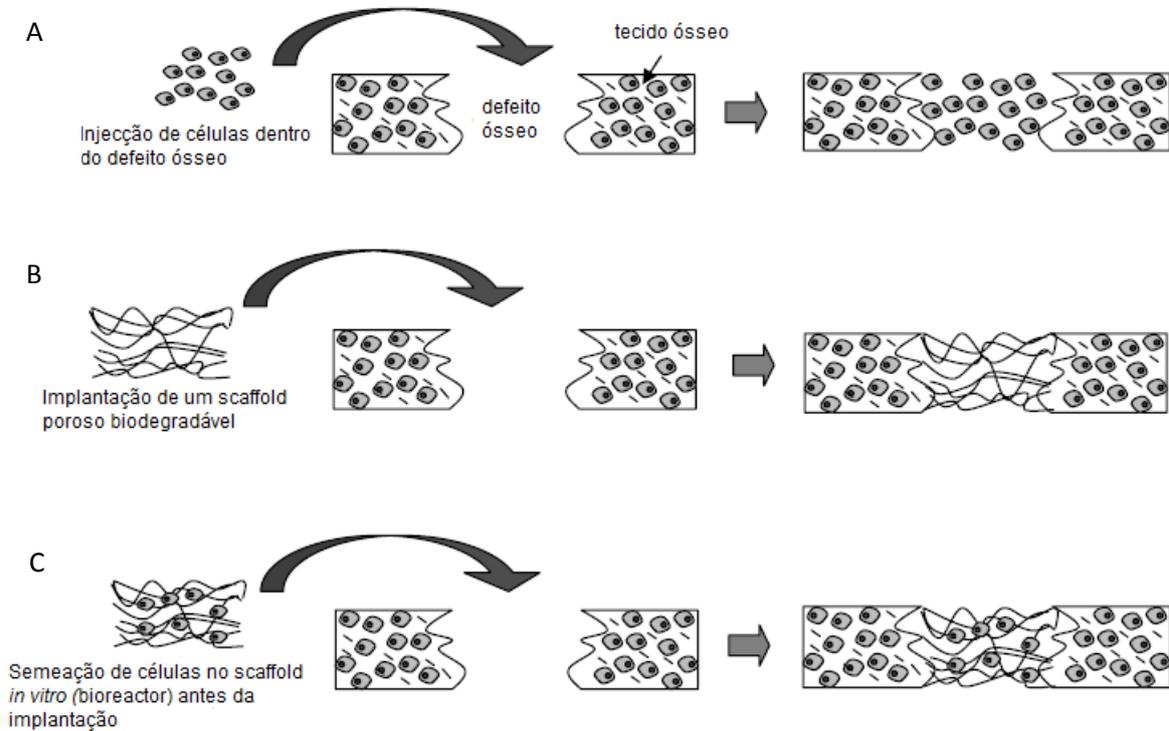
A engenharia de tecidos é uma estratégia promissora que assenta num novo domínio interdisciplinar e que utiliza princípios de engenharia e tecnologias com o objectivo de criar suportes biológicos capazes de restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos. Estes suportes denominados “*scaffolds*” são estruturas porosas maioritariamente tridimensionais que, quando implantadas *in vivo*, servem como suportes para a adesão e proliferação de células e para a deposição de matriz extracelular e, consequentemente, para o crescimento dos tecidos [4, 30, 32, 33].

A engenharia de tecidos pode reunir contributos de estratégias diferentes: (1) estratégias com base celular; (2) com base em factores de crescimento; (3) estratégias baseadas na matriz e (4) estratégias mistas. No campo da engenharia de tecido ósseo, estes contributos exigem interacção entre elementos osteogénicos, osteoindutores e osteocondutores. Componentes osteogénicos incluem células aptas para a produção de tecido ósseo mineralizado, tais como células osteoprogenitoras e osteoblastos diferenciados. Factores osteoindutores incluem produtos bioactivos que induzem o recrutamento, a diferenciação e a proliferação dos tipos de células adequadas à reparação de uma lesão. Um material que suporta em si o crescimento do osso demonstra osteocondutividade. Um *scaffold* osteocondutivo deve providenciar um suporte mecânico, locais para a ligação, proliferação e migração celular e permitir a adsorção e libertação de factores de crescimento [34].

Na sua essência, a engenharia de tecido ósseo combina as células progenitoras, tais como células estaminais mesenquimais ou células maduras (para a osteogénese), semeadas em *scaffolds* biocompatíveis e com estruturas tridimensionais semelhantes à do osso nativo (osteocondução), com factores de crescimento adequados (osteoindução), a fim de gerar e manter o tecido ósseo formado [30].

Foram adoptadas três abordagens gerais (que estão esquematicamente representadas na Figura 3) para a reparação óssea utilizando células osteogénicas e *scaffolds*. A primeira abordagem consiste na implantação directa das células osteogénicas. (Figura 3A). A segunda abordagem baseia-se na implantação directa *in vivo* do *scaffold* poroso, onde ocorre o crescimento do tecido e das células (Figura 3B). Na terceira abordagem, considera-se primeiro um período de cultura num ambiente *in vitro* (num bioreactor) onde se realiza a expansão celular e a pré-diferenciação osteogénica, que demonstra obter uma melhor regeneração e cicatrização do defeito ósseo em relação às abordagens anteriores (Figura 3C). Várias outras etapas podem ser

adicionadas nestas abordagens, tanto na preparação da suspensão de células como na preparação do *scaffold* [3, 5, 31].



**Figura 3 – Representação esquemática das três estratégias principais da engenharia de tecidos que podem ser usadas para regenerar defeitos nos tecidos ósseos. Adaptado de: [31].**

### 2.2.1. *Scaffolds* para engenharia de tecidos ósseos

Qualquer tecido biológico está organizado numa matriz em que se inserem um ou vários tipos de células. A matriz é, *in vivo*, um *scaffold* 3D que proporciona às células a arquitectura específica para o seu desenvolvimento. Por outro lado, serve como um reservatório de água, nutrientes, citocinas e factores de crescimento. Neste sentido, e com o fim de favorecer ou acelerar o restabelecimento da função ou da regeneração dos tecidos lesados é necessário um molde, um *scaffold*, normalmente feito de material poroso degradável, que irá funcionar como uma matriz temporária para a proliferação celular e deposição de matriz extracelular, com conseqüente crescimento ósseo, até que o novo tecido seja completamente restaurado/regenerado. Os requisitos para um *scaffold* ideal estão em destaque na Tabela 3 e têm uma influência não só na sobrevivência das células, sinalização, crescimento, propagação e reorganização, mas também na sua expressão de genes e preservação do seu fenótipo [1, 35].

Tabela 3 - Requisitos para um *scaffold* ideal para engenharia de tecido ósseo.**Um *scaffold* ideal para reparação óssea deve:**

Ser **biocompatível**, isto é, tem a capacidade para suportar a actividade celular normal, sem qualquer efeito tóxico local ou sistémico, para o hospedeiro [1, 35, 36].

Possuir **propriedades de superfície** adequadas, tais como rugosidade, molhabilidade, energia e carga de superfície, que promovam a adesão e diferenciação de células, bem como a adsorção dos metabólitos biológicos [5, 6].

Ser **bioactivo**, ou seja, deve possuir biomateriais capazes de formar uma camada de hidroxiapatite carbonatada à sua superfície que permita uma ligação química com o osso nativo [4, 6].

Apresentar **propriedades mecânicas** semelhantes às do osso hospedeiro, de modo a proporcionar estabilidade estrutural no local da lesão. Neste caso, o biomaterial escolhido deve possuir resistência mecânica suficiente para suportar a carga fisiológica do corpo, e absorver os estímulos mecânicos necessários para o crescimento natural na área afectada [1, 34, 36].

Apresentar uma **estrutura de poros** com diâmetro adequado e uma geometria totalmente interligada que proporcione ao implante uma distribuição adequada das células para facilitar a nova vascularização. Para além disso, é importante haver uma grande área disponível para as inúmeras interacções celulares [1, 37].

Ser **biodegradável**, ou seja, fornece inicialmente uma estrutura estável para a formação do tecido, mas degrada-se controladamente, permitindo uma transferência de carga gradual do osso, aumentando o espaço para a regeneração do novo tecido, de tal modo que no momento em que o local da lesão esteja totalmente regenerado, o *scaffold* deva estar totalmente degradado. Os produtos de degradação deverão ser não tóxicos e facilmente excretados pelo corpo [1, 6, 34, 38].

Ser conformável por **técnicas de processamento** capazes de moldar o *scaffold* de acordo com a geometria do defeito no osso do paciente [6, 36].

Ser **esterilizável** e cumprir os requisitos legais para utilização clínica [36].

**2.2.2. Materiais**

A escolha do material mais apropriado para a produção de um *scaffold* é um passo muito importante na construção de um produto da engenharia de tecidos, uma vez que as suas propriedades irão determinar, em grande parte, o desempenho do *scaffold* [1].

A matriz óssea natural engloba, na sua composição, um composto de cerâmico (apatite natural) e um polímero biológico (colagénio). A hidroxiapatite carbonatada representa cerca de dois terços do peso do osso e a parte restante corresponde às fibras de colagénio. Estas são resistentes e flexíveis, suportando assim o alongamento, a torção e a flexão. Têm sido desenvolvidos inúmeros *scaffolds* para a engenharia de tecidos ósseos ao longo dos anos, recorrendo a uma vasta gama de materiais e processos de fabrico. Os metais e a maioria dos cerâmicos não são biodegradáveis, o que limita o campo de escolha no qual os polímeros continuam a ser os compostos mais investigados, seguidos dos cerâmicos e, muitas vezes, sendo utilizados em combinações compósitas [1, 8, 22].

Alguns **cerâmicos** têm uma longa história de utilização clínica em cimentos ósseos por serem biocompatíveis, osteocondutores e bioativos, e ligam-se quimicamente ao osso quando implantado. Os cerâmicos mais estudados são a HAp e o  $\beta$ -TCP (fosfato tricálcico de origem sintética) devido à sua semelhança com a fase mineral do osso. Foram testadas várias formulações destes cerâmicos, incluindo misturas bifásicas, com biocompatibilidade e osteocondução comprovada, mas com integridade estrutural limitada. Os principais inconvenientes destes materiais cerâmicos são a sua fragilidade e a falta de elasticidade, oferecendo assim uma baixa estabilidade mecânica, o que impede a sua utilização na regeneração de grandes defeitos ósseos. Além disso, devido a factores biológicos que se verificam após a implantação *in vivo*, como a actividade dos osteoclastos, o controlo da degradação e da dissolução do *scaffold*, a predictibilidade clínica da sua aplicação é, por vezes, limitada. Estas limitações podem comprometer a estabilidade mecânica do local implantado e aumentar eventualmente as concentrações extracelulares de Ca e P, o que pode ter um efeito citotóxico [1, 5, 18].

Como uma alternativa aos materiais acima referidos, existem **polímeros** naturais ou sintéticos, inertes e biodegradáveis e, portanto, com propriedades ideais para o uso em *scaffolds* para a medicina regenerativa. Adicionalmente, os polímeros oferecem uma grande vantagem em relação aos cerâmicos: a flexibilidade [1, 22, 34].

Os **polímeros naturais** tais como o colagénio, a fibrina, o ácido hialurónico e o quitosano são utilizados em engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade, ao seu potencial comportamento bioactivo, à sua versatilidade química e, em alguns casos, devido à sua disponibilidade (tal como o quitosano) que é quase ilimitada. No entanto, a utilização destes materiais é limitada pela sua baixa estabilidade mecânica, já que se degradam rapidamente em meio biológico [1, 5, 39].

Os **polímeros sintéticos** biodegradáveis oferecem uma enorme versatilidade, pois as suas propriedades mecânicas e degradação podem ser modificadas através da manipulação da sua composição e condições de processamento. São exemplos deste tipo de polímeros os poli( $\alpha$ -hidroxiésteres), que inclui o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e o seu co-polímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). Estes degradam-se por hidrólise e os seus produtos de decomposição podem ser removidos por vias metabólicas fisiológicas. No entanto, os polímeros têm capacidades limitadas em conseguir uma boa ligação e integração com o osso e, tal como os polímeros naturais, possuem fracas propriedades mecânicas. Os polímeros exibem um módulo de elasticidade tipicamente entre 7 MPa para os materiais elásticos e 4 GPa para polímeros rígidos, valores estes inferiores ao do osso cortical, que apresenta

módulos de elasticidade de cerca de 17 GPa. Adicionalmente, os polímeros estão sujeitos a mecanismos de deformação, que podem ser significativos à temperatura corporal e sob pressões abaixo dos limites de elasticidade individuais. Assim, os polímeros são frequentemente reforçados com outros materiais e utilizados como compostos [5, 8, 18, 22, 34, 39].

Os materiais **compósitos** são, de uma perspectiva biológica, uma estratégia interessante que pode combinar polímeros e cerâmicos no fabrico de *scaffolds* para regeneração óssea, uma vez que o osso nativo é já uma combinação entre um polímero (i.e., colagénio fibrilar) e um material cerâmico (apatite biológica) que ocorre naturalmente. O desenvolvimento de um *scaffold* de polímero e fosfato de cálcio visa reter as vantagens de ambos os materiais de modo a atender às exigências mecânicas e fisiológicas de um tecido semelhante ao osso. [7, 8].

Estudos realizados por Ito *et al.* [40] demonstram que membranas compósitas de Quitosano/HAp implantadas na calvária de ratos são biologicamente bem toleradas, com a presença de encapsulação fibrosa pouco significativa e ocorrência de osteogénese. Zhang *et al.* [41] demonstraram também que a adição de  $\beta$ -TCP a estruturas de quitosano, que isoladamente são mecanicamente fracas, melhora bastante o módulo de compressão e tensão de cedência dos *scaffolds* compósitos.

Uma outra forma de tornar estas estruturas mecanicamente mais resistentes é a adição de um agente reticulante do quitosano à sua composição. Os reticulantes são moléculas com pelo menos dois grupos funcionais reactivos que permitem a formação de pontes entre as cadeias poliméricas, sendo os mais comuns, no caso do quitosano, os dialdeídos, entre os quais se destaca o glutaraldeído [42, 43].

O quitosano é reticulado pelo glutaraldeído através do seu grupo livre  $-NH_2$ , que reage facilmente com o grupo  $-C=O$  do glutaraldeído formando compostos com uma base de *Schiff* (C=N), como se ilustra na Figura 4. A reticulação irreversível do glutaraldeído através das bases de *Schiff* confere uma alta estabilidade operacional ao quitosano [44, 45].

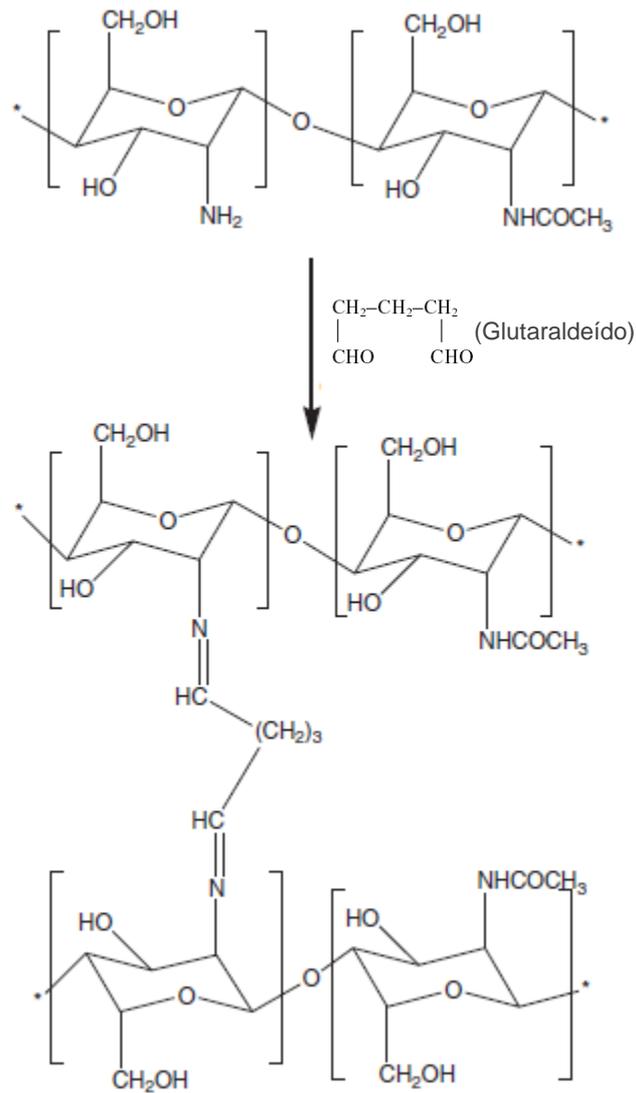


Figura 4 – Ilustração da reticulação da molécula de quitosano pelo glutaraldeído [42].

As estruturas de quitosano reticuladas são mais estáveis quimicamente, exibem uma melhor distribuição do tamanho dos poros e uma maior resistência mecânica. Li *et al.* [46] desenvolveram *scaffolds* de CH/HAp reticulados com glutaraldeído e mostraram que uma reticulação apropriada pode aumentar a resistência mecânica dos *scaffolds* em 45% em comparação com os não reticulados [42].

### 2.3. Resposta celular à superfície e arquitectura dos scaffolds

Todos os biomateriais devem satisfazer certos critérios e requisitos regulamentares antes de poderem ser qualificados para o uso em aplicações médicas [47].

O pré-requisito essencial para qualificar um material como biomaterial é a biocompatibilidade. Esta é definida como a capacidade do material em desempenhar a função desejada no que diz respeito a uma terapia médica, sem provocar quaisquer efeitos locais ou sistémicos indesejáveis no destinatário ou beneficiário dessa terapia. Deve gerar a resposta mais adequada, tanto a nível celular como tecidual, na situação específica de aplicação e apresentar um relevante desempenho clínico no contexto da terapia em apreço. A biocompatibilidade de um *scaffold* refere-se à capacidade deste se comportar de forma apropriada como estrutura e suporte inicial para as células aderirem, proliferarem e se diferenciarem, bem como para permitir a formação de uma matriz extracelular (MEC) adequada com o tecido de implantação [9, 48, 49].

A interacção das células com a MEC é fundamental para os processos de diferenciação e função celular. Esta é um meio complexo composto por várias moléculas (incluindo péptidos, glicoproteínas, factores de crescimento, hormonas, colagénio e outras proteínas) que, para além de proporcionar uma estrutura na qual as células aderem e migram, influencia quase toda a actividade celular, incluindo a arquitectura e movimento celular, a expressão de genes e as respostas a estímulos externos [18, 50].

As respostas celulares face ao biomaterial implantado são diversas e de grande complexidade, variando significativamente consoante as características químicas, físicas e biomecânicas dos *scaffolds*, bem como com o tipo de célula que interage com o material [51].

Na Tabela 4, estão listadas as principais variáveis que podem influenciar significativamente a resposta do hospedeiro.

Tabela 4 - Principais variáveis que podem influenciar a resposta do hospedeiro. Adaptado de: [52].

Principais variáveis que influenciam a resposta do hospedeiro.
Composição do material
Microestrutura do material (à escala micro ou nanométrica)
Teor de água, balanço hidrofobicidade-hidrofilicidade
Composição química da superfície
Rugosidade da superfície
Energia de superfície
Constantes elásticas
Perfil de dissolução/degradação, libertação de produtos de degradação tóxicos (como, por exemplo, iões metálicos para materiais metálicos)
Aditivos, catalisadores, contaminantes e a sua toxicidade (para materiais poliméricos)

Todas estas propriedades dependem do tempo de implantação, temperatura e condições do ambiente, e podem mudar com o ambiente fisiológico durante a aplicação do biomaterial [47].

Seguidamente serão apresentados e discutidos os principais parâmetros que influenciam a biocompatibilidade e que devem ser tidos em consideração no desenvolvimento de *scaffolds* para regeneração de tecido ósseo. É importante entender o comportamento das células em contacto com o *scaffold* no interior da construção 3D, de modo a conceber o *design* mais apropriado do mesmo para engenharia de tecidos.

### 2.3.1. Adsorção de proteínas

O estudo das interacções entre as proteínas e a superfície dos *scaffolds* representa um dos tópicos mais importantes na área dos biomateriais, uma vez que a resposta biológica dos biomateriais implantados *in vivo* é condicionada pela resposta celular inicial, que por sua vez é mediada pela concentração, composição e forma das proteínas adsorvidas na superfície do implante [53, 54].

Quando um material sólido, como é o exemplo do *scaffold*, entra em contacto com um fluido que contém as proteínas solúveis (por exemplo, sangue, fluido intersticial, meios de cultura de células), as proteínas são rapidamente adsorvidas na superfície do material, saturando a superfície num intervalo de tempo de segundos a minutos.

Portanto, quando as células abordam a superfície do biomaterial, entram em contacto não com a sua estrutura molecular de forma directa, mas sim com a camada de proteínas adsorvidas à superfície (ver Figura 5) [53].

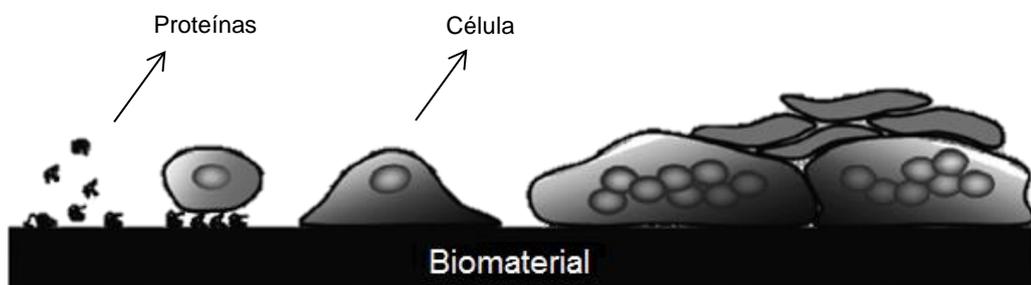


Figura 5 - Ilustração da ligação das células à superfície do material. Adaptado de: [55].

A superfície das proteínas é heterogénea e normalmente expõe cargas positivas e negativas, grupos com propensão para ligações de hidrogénio, bem como regiões não polares. Uma consequência desta complexidade é a de que cada tipo de proteína pode interagir com outras moléculas e superfícies de distintas formas. Existem possibilidade de interacções iónicas (tanto repulsivas como atractivas), ligações de hidrogénio, interacções hidrofóbicas, interacções ácido-base e, claro, as sempre presentes forças de *Van der Waals*. As forças motrizes mais importantes para a adsorção de proteínas são muitas vezes consideradas como as interacções hidrofóbicas e iónicas, combinadas com o aumento de entropia causado pelas alterações da forma da proteína durante a adsorção [56].

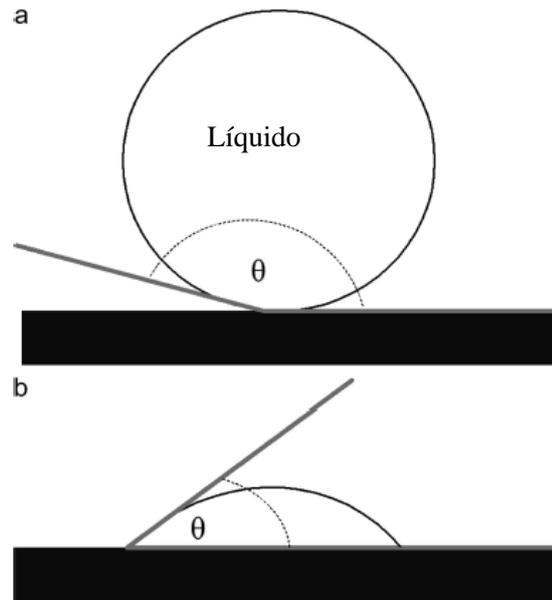
As propriedades das proteínas (tamanho, carga e a sua estrutura) e as propriedades das superfícies (molhabilidade, carga e energia de superfície e rugosidade) com as quais as biomoléculas interagem podem influenciar os eventos interfaciais, como será detalhado nos subcapítulos seguintes [57].

### 2.3.2. Molhabilidade

O efeito da molhabilidade nas interacções entre células e biomateriais tem sido extensivamente estudado devido à sua importância no *design* destes [58]. A molhabilidade reflecte a hidrofilicidade ou hidrofobicidade do material, que pode ser medida através do ângulo de contacto. Considerando uma gota de líquido em repouso sobre a superfície (ver Figura 6), o ângulo de contacto é definido como o ângulo formado

pela intersecção da interface sólido-líquido e a interface líquido-vapor (geometricamente adquirido através da aplicação de uma recta tangente entre a superfície da gota e o ponto de inserção com o material [9, 59-62].

Quanto mais baixo for o ângulo de contacto, mais hidrofílica é a superfície (ver Figura 6) [9].



**Figura 6 - Ângulo de contacto,  $\theta$ , para (a) superfícies hidrofóbicas e (b) superfícies hidrofílicas. Adaptado de: [63].**

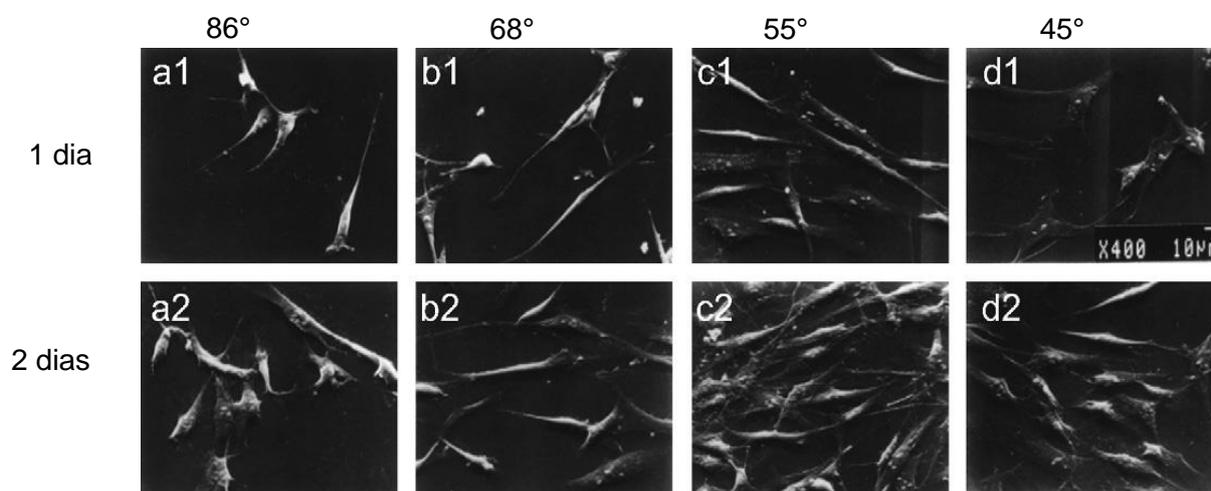
A hidrofobicidade/hidrofiliidade é o parâmetro inicial que poderá afectar a adsorção das proteínas [64]. Dependendo do tipo de proteínas e células, estas podem preferir superfícies mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas mas, na generalidade e segundo alguns autores, as superfícies mais hidrofílicas são mais propensas a induzir uma boa adsorção de proteínas e, conseqüentemente, favorecer a adesão celular [65].

As proteínas em contacto com superfícies hidrofóbicas são submetidas a uma alteração conformacional para se aderirem, o que conduz a uma diminuição da acessibilidade dos locais de adesão. Uma alta hidrofobicidade pode também afectar a acessibilidade aos poros do *scaffold* por parte das células, uma vez que a penetração da suspensão aquosa de células é retardada, ocorrendo uma distribuição celular irregular [63, 64].

No entanto, superfícies altamente hidrofílicas não conduzem necessariamente a superfícies mais biocompatíveis. Por exemplo, estudos realizados com a introdução de células osteoblásticas (células MG-63) em superfícies de diamante nanocristalino com

terminações de oxigénio (ângulo de contacto entre 20°-35°) demonstraram uma alta tendência para desprendimentos espontâneos das células [61, 63, 66].

Faucheux *et al.* [67] usaram a auto-montagem de monocamadas de organosilanos na preparação de superfícies com diferentes ângulos de contacto, para testar o seu efeito na adesão celular. Foram criadas monocamadas hidrofóbicas (ângulo de contacto de 80°), moderadamente hidrofílicas (ângulo de contacto entre 48°- 62°) e hidrofílicas (35°). Estas superfícies foram expostas a proteínas plasmáticas (fibronectina e vitronectina). Os resultados mostraram que houve uma boa adesão para as superfícies moderadamente hidrofílicas, enquanto a adesão das proteínas foi limitada nas restantes superfícies. Posteriormente expuseram-se os biomateriais a células fibroblásticas humanas. As células que aderiram às superfícies moderadamente hidrofílicas mostraram um crescimento linear enquanto que nas superfícies “altamente” hidrofóbicas e hidrofílicas, o crescimento dos fibroblastos foi bastante reduzido. Isto demonstra que a adesão das células é claramente mediada pela adesão das proteínas, que são significativamente influenciadas pela molhabilidade da superfície. Lee *et al.* [68], através de estudos *in vitro* também com fibroblastos, indicam que o máximo de adesão celular destas células se dá em torno do ângulo de contacto de 55° (ver Figura 7).



**Figura 7 - Micrografias SEM da adesão celular de fibroblastos em superfícies de PE após 1 e 2 dias de cultura com diferentes ângulos de contacto (magnificação original x400) [57]. Como se pode verificar, o máximo de adesão celular dos fibroblastos dá-se ao segundo dia, com o ângulo de contacto de 55°.**

Deste modo, verifica-se que superfícies com molhabilidade moderada são capazes de absorver uma quantidade adequada de proteínas e ao mesmo tempo

preservar a sua conformação natural, o que resulta numa resposta celular positiva [58, 61].

Uma vez que a maioria dos polímeros é hidrofóbica, criou-se a necessidade de manipular a sua superfície, de modo a controlar a hidrofobicidade do material. Uma metodologia parece ser o tratamento com plasma, através do qual se pode facilmente introduzir nas superfícies dos polímeros grupos polarizáveis, como é o caso dos grupos hidroxilo, carboxilo e amina usando diferentes reacções de gases. Um outro método utilizado é a deposição de polímeros hidrofílicos nas superfícies dos biomateriais, através da co-polimerização [61].

### 2.3.3. Carga e energia de superfície

Sabe-se que o comportamento celular, em termos de adesão e proliferação, depende da propensão físico-química da superfície, o que pode ser também descrito em termos de carga e energia de superfície. Os iões presentes nas superfícies dos materiais podem interagir com receptores celulares provocando a adesão celular e o crescimento [69].

Muitos estudos recentes revelaram que o tipo e a composição de grupos funcionais da superfície desempenham um papel importante no controlo da adesão de proteínas, das células e nas respostas do tecido aos biomateriais [70, 71].

Em geral, grupos que contêm oxigénio (-OH e -COOH por exemplo) aumentam a componente da energia livre da superfície, tornando-a mais hidrofílica e assim mais susceptível à adsorção e adesão das proteínas da MEC (por exemplo, vitronectina, fibronectina e colagénio). Em contraste, a adição de grupos metil (CH<sub>3</sub>-) confere à superfície funcionalidade hidrofóbica [71, 72]. Keselowsky *et al.* [73] relataram que as superfícies carregadas com diferentes grupos funcionais (-CH<sub>3</sub>, -OH, -COOH e -NH<sub>2</sub>) modularam de forma diferente a adsorção da proteína fibronectina, tendo esta seguido uma tendência para se ligar a -OH > -COOH = -NH<sub>2</sub> > -CH<sub>3</sub>.

Um material com uma carga de superfície positiva ou negativa é considerado hidrofílico, enquanto uma superfície com uma carga neutra é maioritariamente hidrofóbica [70].

Muitos investigadores descreveram que a funcionalidade celular ocorre quando se utilizam cargas positivas e/ou cargas negativas (ou seja, em materiais hidrofílicos) [34]. Por exemplo, Schneider *et al.* [74] mostraram que os hidrogéis HEMA que incorporam

cargas positivas suportam significativamente melhor a adesão e o espalhamento dos osteoblastos e fibroblastos comparando com os hidrogéis com cargas neutras e negativas (Figura 8).



**Figura 8 - As densidades de carga positiva em hidrogéis HEMA suportam uma melhor fixação e espalhamento celular em relação às cargas negativas e neutra. Adaptado de: [74].**

Por outro lado, Thevenot *et al.* [71] mencionaram que a incorporação de cargas negativas também pode facilitar a adsorção de proteínas que promovem a adesão celular.

#### **2.3.4. Rigidez**

As propriedades mecânicas do substrato também desempenham um papel importante na resposta das células [3]. Diversos estudos relataram que a adesão celular, proliferação e diferenciação são moduladas pela rigidez do substrato. Os tecidos sólidos exibem uma variação na rigidez, que pode ser medida através do módulo de elasticidade,  $E$ , também conhecido como módulo de Young [9, 75].

A adesão das células e a sua interação com o substrato dão-se através de receptores incorporados na sua superfície, que são maioritariamente integrinas (Figura 9). As células respondem à rigidez alterando a expressão de integrinas e a organização do citoesqueleto (criando fibras de *stress* de actina-miosina) para estabelecerem um equilíbrio de forças entre a força gerada pela célula e a resistência originada pelo substrato. O aparecimento de fibras de *stress* de actina é abrupto e completo apenas quando a célula se encontra num substrato com um intervalo de rigidez adequado [76, 77].

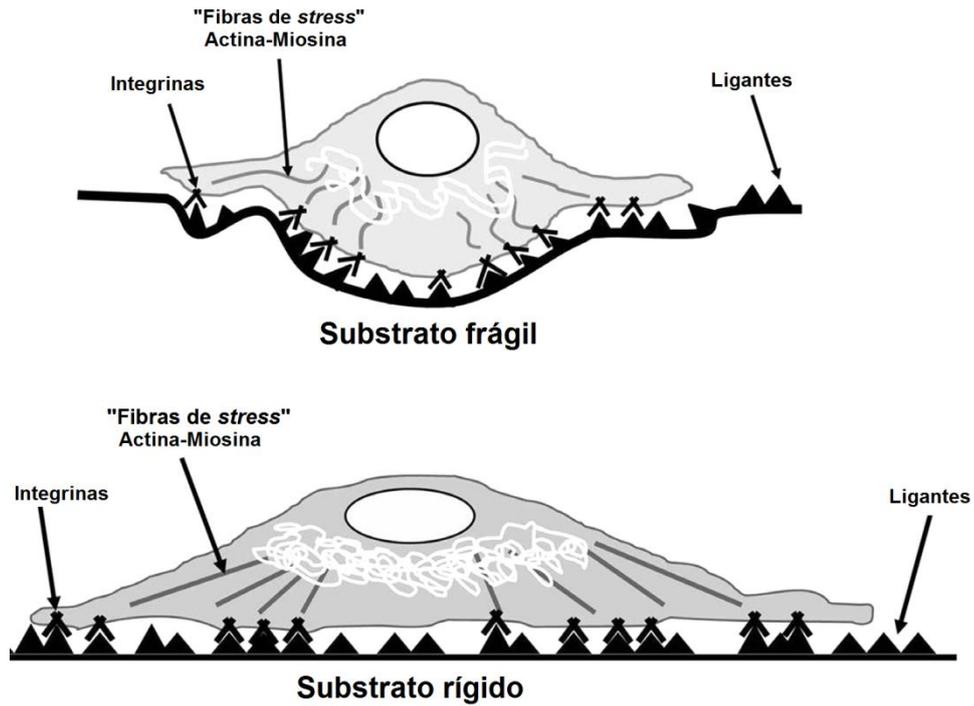
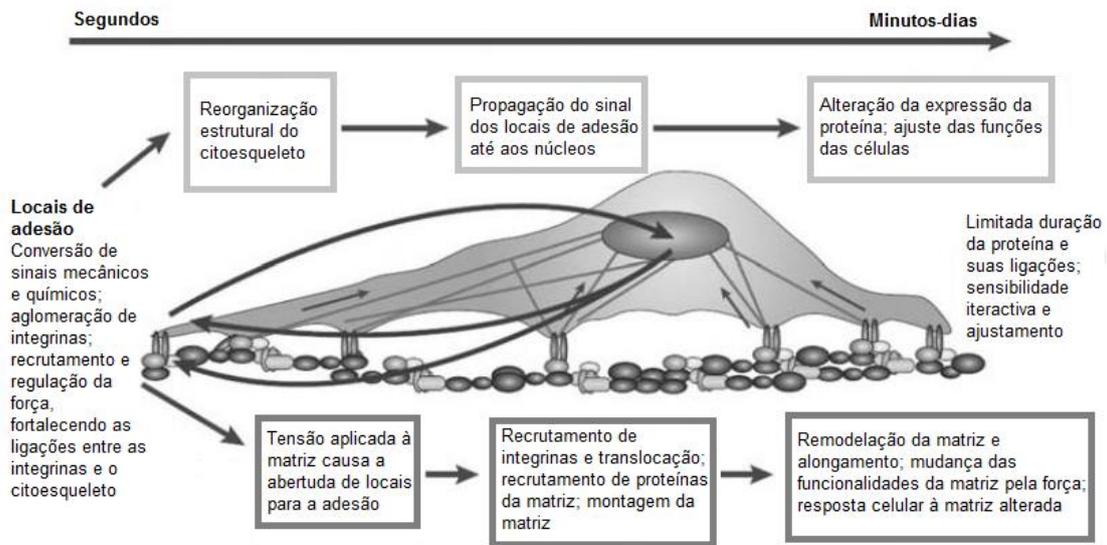


Figura 9 – Ilustrações que descrevem a ligação de uma célula a substratos frágeis e rígidos. Adaptado de: [78].

Para além disso, as células demonstram respostas mecanotransductoras sondando a rigidez do seu substrato, entre outras propriedades mecânicas internas, reagindo através de mediadores bioquímicos e adaptando o seu citoesqueleto, que têm a capacidade de alterar a estabilidade celular, a morfologia e a expressão génica [79, 80]. A Figura 10 representa a sequência temporal dos principais processos associados à resposta celular face à rigidez do substrato.



**Figura 10 - Sequência temporal dos processos associados à resposta celular face à rigidez do substrato. As células sondam continuamente as propriedades mecânicas do seu substrato, induzindo a sinais que têm rapidamente impacto na organização do citoesqueleto e na matriz. Estas alterações induzem distintas respostas numa vasta gama de funções celulares. Adaptado de: [77].**

A difusão e a mobilidade das células são mais elevadas em substratos rígidos, o que favorece as interações célula-célula e célula-material, levando a agregados celulares mais organizados. Para além disso, no caso de existir um gradiente de rigidez no substrato, as células migram para as regiões mais rígidas [3]. Engler *et al.* [75] prepararam géis de poli(acrilamida) (PA) com diferentes módulos de elasticidade para estudar a relação entre a área de difusão de células do músculo liso e a rigidez dos substratos, onde se verificou que as células demonstraram uma melhor adesão para o substrato mais rígido.

Em contraste, *scaffolds* com uma superfície flexível não conseguem induzir uma organização adequada do citoesqueleto, promovendo a retracção do corpo celular, que induz a inibição da proliferação e diferenciação [32].

### 2.3.5. Rugosidade

A rugosidade da superfície do material (ou topografia) corresponde à escala de irregularidades da superfície. Este é outro factor importante que afecta a adesão celular e o seu comportamento, tendo uma influência directa tanto *in vitro* como *in vivo* na morfologia celular, proliferação e expressão fenotípica [9, 66].

O parâmetro mais utilizado para caracterizar a rugosidade da superfície é  $R_a$ , que consiste na medição média dos picos e dos vales das irregularidades presentes na superfície do material. No entanto, esta medida não dá qualquer registo do tipo de topografia da superfície como, por exemplo, o espaçamento entre as irregularidades, as suas formas diferentes (pirâmides, cones, cristas, sulcos), a curvatura dos vales e, especialmente, o aguçamento dos picos na superfície do material, sendo por vezes necessário recorrer a outros parâmetros (como, por ex. a rugosidade máxima e a rugosidade de profundidade média) [66].

Dependendo da escala de irregularidades à superfície do material, esta varia entre macro-rugosidades (de 100  $\mu\text{m}$  a milímetros), micro-rugosidades (de 100 nm a 100  $\mu\text{m}$ ) e nano-rugosidades (menos de 100 nm), cada uma com a sua influência específica no comportamento biológico do implante. Para cada tipo de células acredita-se que existe uma gama de valores de rugosidades preferida, em termos da sua actividade funcional [66, 81].

Várias investigações têm relatado que células com maior dimensão (por exemplo osteoblastos e neurónios) cultivadas em superfícies com micro-rugosidades apresentaram bons resultados na diferenciação celular em comparação com superfícies lisas. Por exemplo, os osteoblastos de ratas apresentaram maior proliferação e aumento da síntese de fosfatase alcalina (ALP) e expressão da osteocalcina em superfícies rugosas (0,81  $\mu\text{m}$ ) em comparação com as lisas (Hatano *et al.* [82]). No caso de células osteoblásticas fetais humanas (hFOB 1,19), foi relatado um aumento semelhante da adesão e proliferação celular em superfícies rugosas (Lime *et al.* [83]).

No entanto, existem também trabalhos que demonstram que a funcionalidade das células osteoblásticas aumenta nas nanosuperfícies. Como é conhecido, o osso é um nanocompósito formado por proteínas com constituintes em nanoescala e por hidroxiapatite carbonatada (HCA) nanocristalina [84, 85]. Assim, postulou-se que a rugosidade à nanoescala da superfície do material também pode ser vantajosa pois assemelha-se à nanoarquitetura natural [86].

Para células menores, tais como células endoteliais da veia humana, a rugosidade em escala nanométrica da superfície dos biomateriais é preferível para uma boa adesão e proliferação celular (Chung *et al.* [87]).

Deste modo, a selectividade das células na rugosidade pode ser altamente vantajosa para o desenvolvimento de novos biomateriais.

### 2.3.6. Porosidade e tamanho dos poros

A migração celular é modulada por um conjunto complexo de mecanismos biofísicos que são influenciados não só pela bioquímica da sinalização extracelular e intracelular, mas também pelo ambiente extracelular circundante. Deste modo, a porosidade do *scaffold*, o tamanho dos poros, a sua morfologia e interconectividade são propriedades essenciais para uma boa fixação, crescimento e motilidade das células e, assim, para a formação de um novo tecido a três dimensões [9, 10].

Os *scaffolds* para osteogénese devem mimetizar a morfologia, estrutura e função do osso, a fim de otimizar a integração no tecido circundante. Existem diversos métodos de processamento de materiais onde é possível obter *scaffolds* com diferentes tipos de porosidades (Figura 11).

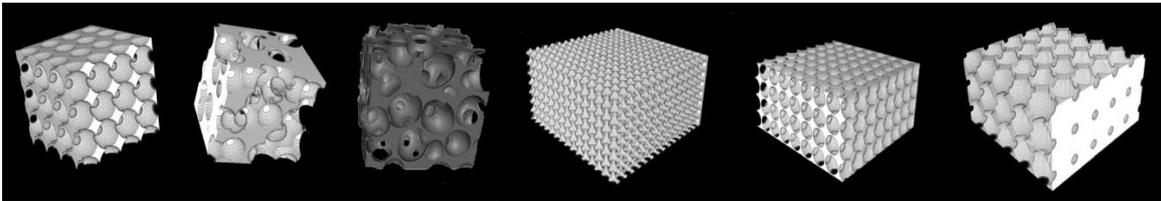


Figura 11 - Scaffolds com diferentes tipos de porosidades. Adaptado de: [88].

O tecido ósseo é composto pelo osso trabecular com 50-90% de porosidade e tamanho dos poros na ordem de 1mm de diâmetro e pelo osso cortical (com cerca de 5-13% de porosidade). A dimensão mínima do poro exigida para regenerar osso mineralizado é aproximadamente de 100  $\mu\text{m}$ , como comprovado pelo estudo de Hulbert et al.[89]. No entanto, o tamanho dos poros na gama dos 200-350  $\mu\text{m}$  é o mais indicado para suportar uma vascularização suficiente para o tecido. Além disto, estudos recentes têm indicado que as multi-escalas de matrizes porosas, envolvendo tanto porosidades na escala micro como macro, podem ser mais eficazes do que apenas matrizes porosas numa só escala [22, 23, 90, 91].

Os estudos de Holly *et al.* descrevem um conceito diferente. Os autores acreditam que a reconstrução óssea só será alcançada se a matriz 3D apresentar uma estrutura macroporosa, com grande interligação dos poros que devem variar entre 1,2 – 2.0 mm. Esta abordagem apresenta vantagens evidentes, pois permite a existência de espaço para o crescimento tecidular. No entanto, as propriedades mecânicas são severamente afectadas [92].

Diferentes células respondem de modo diferente ao tamanho de poros do *scaffold*, devido às diferenças no tamanho da célula e no mecanismo de adesão celular. Por exemplo, os fibroblastos (tamanho da célula 20-50  $\mu\text{m}$ ) sendo menores que as células endoteliais (tamanho da célula 60-200  $\mu\text{m}$ ) podem colmatar poros menores presentes nas estruturas [81]. Na tabela seguinte encontram-se os tamanhos de poros preferidos para diferentes tipos de células.

**Tabela 5 – Tamanho(s) do(s) poro(s) desejados em *scaffolds* destinados a diferentes tipos de células. Adaptado de:[81].**

Células	Tamanho da célula ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro do poro preferencial ( $\mu\text{m}$ )
Hepatócitos	20-40	20
Fibroblastos	20-50	90-360
Osteoblastos	20-30	100-350

A interconectividade dos poros influencia positivamente a taxa de deposição óssea e a profundidade de infiltração celular, *in vitro* e *in vivo*. Os poros interconectados regularmente fornecem espaço para o suprimento de nutrientes, remoção de resíduos e permite a troca de oxigênio nas regiões internas da matriz, mantendo a viabilidade das células. A combinação do tamanho do poro e a interligação necessária para a osteocondutividade ideal têm ainda de ser determinadas, tornando o ajuste destes parâmetros um aspecto importante para a produção do *scaffold* [9, 91].

Apesar dos *scaffolds* com alta porosidade (cerca de 90%) serem os que facilitam o melhor crescimento celular e deposição da MEC, a porosidade faz diminuir as propriedades mecânicas, aumentando a complexidade da fabricação do *scaffold*. Por outro lado, materiais biocerâmicos porosos podem apresentar porosidades próximas da do osso cortical e os polímeros porosidades próximas da do osso trabecular, quando devidamente processados. Assim, a combinação destes dois biomateriais pode permitir a manipulação da porosidade total, ajustando-se assim aos requisitos específicos do local onde se pretende implantar o *scaffold* [35, 81, 91].

## 2.4. Testes de Biocompatibilidade

Todos os materiais que são colocados em contacto com o tecido humano devem, numa fase inicial, ser testados *in vitro* e *in vivo* de modo a avaliar a sua biocompatibilidade a partir do conhecimento das respostas biológicas obtidas [12].

A biocompatibilidade deve ser testada preferencialmente *in vitro* antes de ser avaliada *in vivo*. Para aplicações em engenharia de tecidos, a citocompatibilidade do biomaterial é particularmente importante dado que se avalia a resposta das células que estão em contacto directo com o material. A compatibilidade *in vitro* pode ser testada pela exposição directa das células com a superfície do *scaffold*, indirectamente pela exposição celular aos produtos de degradação do *scaffold* ou, indirectamente, com uma camada interposta entre as células e os biomateriais. É assim possível, através destes testes, estudar a viabilidade, proliferação e diferenciação celulares, obtendo uma rápida avaliação com base em dados quantitativos e comparáveis e, devido à sensibilidade dos testes, descartar num período inicial de caracterização, os materiais não biocompatíveis [11-13].

Os ensaios de biocompatibilidade *in vitro* são experimentalmente controláveis, facilmente reprodutíveis, de processamento relativamente rápido e relativamente económicos. A somar a estas vantagens, estes testes evitam geralmente os problemas éticos e legais que se colocam no uso de animais e seres humano em testes. A principal desvantagem dos testes de biocompatibilidade *in vitro* é a sua relevância clínica que pode ser questionada, necessitando de ser posteriormente confirmados, por metodologias *in vivo*, os resultados *in vitro* [93].

O sub-capítulo que se segue resume algumas das metodologias *in vitro* utilizadas na avaliação da biocompatibilidade de novos *scaffolds* para regeneração óssea.

### 2.4.1. Sistemas de testes estabelecidos

A existência de testes *standard* é fundamental para estabelecer uma série de orientações e permitir comparações entre diferentes estudos. A *International Standard Organization* (ISO) estabeleceu um conjunto de directrizes para garantir a segurança dos dispositivos médicos. As normas ISO 10993, com 18 partes, descrevem os testes biológicos que se devem ser realizados para a validação da utilização de dispositivos médicos. Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade são os primeiros testes para avaliar a biocompatibilidade de qualquer tipo de material para uso como dispositivo médico,

reconhecido em 1987 pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), e em 1993 pela *Food and Drug Administration* (FDA). Só depois de se provar a ausência total de citotoxicidade é que se efectuam os estudos subsequentes de biocompatibilidade, geralmente recorrendo a modelos animais [14, 94].

Nestas normas, a citocompatibilidade é analisada a partir de: (a) avaliação dos danos celulares por meios morfológicos, (b) medições do dano celular, (c) medições do crescimento celular e (d) medições de aspectos específicos do metabolismo celular [95].

#### **2.4.2. Testes *in vitro* para avaliação da biocompatibilidade**

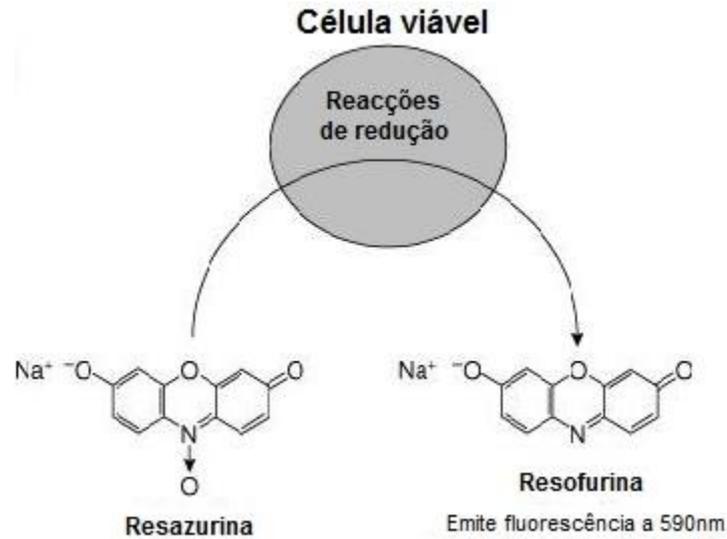
Existe uma variedade de métodos para testar a citotoxicidade a resposta biológica. Para a avaliação de todos os fenómenos mencionados na secção anterior, existem diversas metodologias que se encontram seguidamente detalhadas.

##### **Ensaio de viabilidade/proliferação**

- LDH - Consiste na libertação de uma enzima (lactato-desidrogenase), usualmente intra-celular, que chega até ao meio de cultura (ambiente extracelular), quando ocorre lesão da membrana citoplasmática. É assim possível medir com precisão a integridade da membrana celular e, conseqüentemente, a viabilidade celular [14].
- Glutathione - É um ensaio luminescente baseado na detecção e quantificação de glutathione (GSH) nas células ou em várias amostras biológicas. A alteração nos níveis de GSH é importante na avaliação das respostas toxicológicas e é um indicador de stress oxidativo, o que pode conduzir à apoptose ou morte celular [96].
- Fluorimetria - Utilização de corantes fluorescentes que se ligam especificamente ao DNA e RNA. A fluorescência dos corantes aumenta quando estes se ligam aos ácidos nucleicos, havendo possibilidade de assim fazer a quantificação do DNA [97].

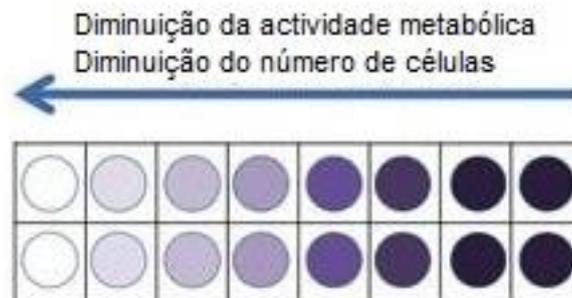
##### **Ensaio de actividade metabólica**

- Alamar Blue (Resazurina) - Alamar Blue é um corante solúvel em água que quando adicionado a células viáveis, a sua forma oxidada entra no citosol e é convertido para a sua forma reduzida pela actividade das enzimas mitocondriais bem como a partir dos citocromos (Figura 12). Esta reacção é acompanhada por uma mudança de cor do meio de cultura, que pode ser facilmente medida pela leitura colorimétrica ou fluorimétrica [98].



**Figura 12 – Conversão da resazurina a resofurina por células viáveis, resultando num produto fluorescente. A fluorescência produzida é proporcional ao número de células viáveis. Adaptado de: [99].**

- MTT - É um ensaio colorimétrico que tende em reflectir a actividade mitocondrial pela redução metabólica de um sal amarelo solúvel de tetrazólio num produto insolúvel azul – o formazano (Figura 13). Os sais de tetrazólio aceitam electrões de substratos oxidados ou enzimas adequadas, tais como NADH e NADPH. Esta reacção converte os sais de amarelo para azul de formazano, que podem ser dissolvidos num solvente orgânico. Assim, qualquer aumento ou diminuição no número das células viáveis pode ser detectado pela medição da concentração de formazano reflectido através de um espectrofotómetro [100-102].



**Figura 13 - Ensaio colorimétrico – MTT. Adaptado de: [103].**

- Método de Bradford – É um ensaio de quantificação da proteína total. O ensaio é baseado na observação das mudanças da absorvância máxima para uma solução ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250, entre 465 nm a 595 nm, que é quando a ligação

proteica ocorre. Tanto as interacções hidrofóbicas como as iónicas estabilizam a forma aniónica do corante, provocando uma alteração de cor visível [104].

### Avaliação da morfologia

A avaliação da morfologia é normalmente efectuada com base em técnicas de microscopia, designadamente a microscopia electrónica de varrimento (SEM) e a microscopia de fluorescência/confocal após marcação fluorescente.

Ambas permitem a contagem celular e a sua observação morfológica. A Figura 14 mostra exemplos de imagens possíveis de obter através dos tipos de microscopia descritos.

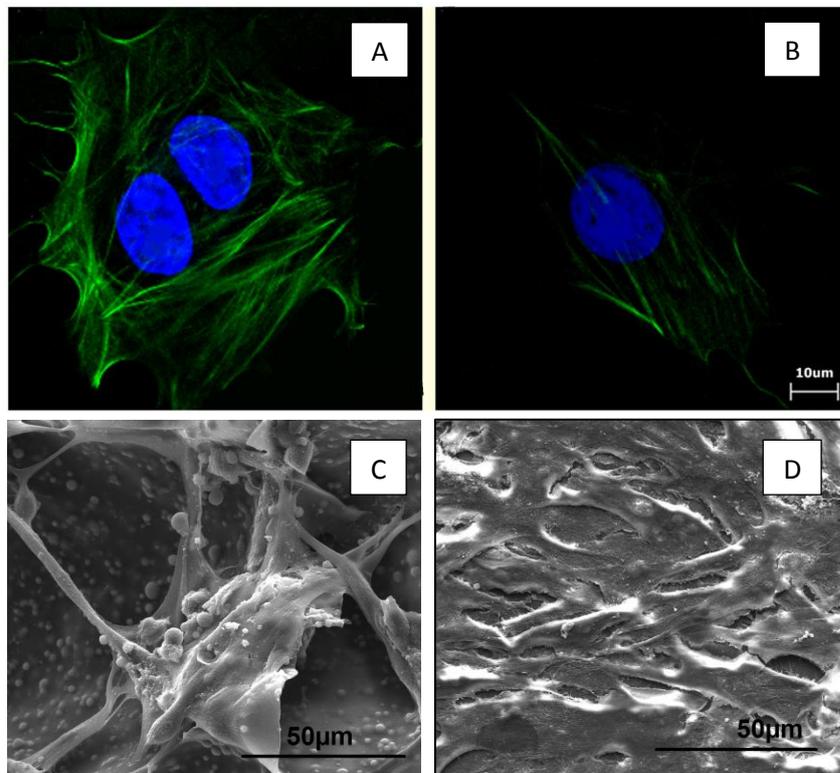


Figura 14 - Exemplos de imagens de microscopia de fluorescência (A,B) e de microscopia electrónica de varrimento (C,D) de células MG63. Adaptado de:[105].

### Actividade funcional

- PCR - Esta técnica baseia-se na amplificação exponencial selectiva de uma pequena quantidade de DNA de um determinado conjunto de células, através de um mecanismo de síntese artificial de DNA num processo em cadeia que imita a replicação do DNA. Trata-se de um método rápido e eficiente para amplificação de sequências específicas a partir de uma mistura complexa de sequências genómicas ou DNA

complementar. A reacção da PCR envolve três fases: a fase de desnaturação pelo calor, a fase de *annealing* e a fase de extensão que podem ser observadas na Figura 15. Com este método é possível amplificar milhões de vezes e em poucas horas pequenas quantidades de material genético [106].

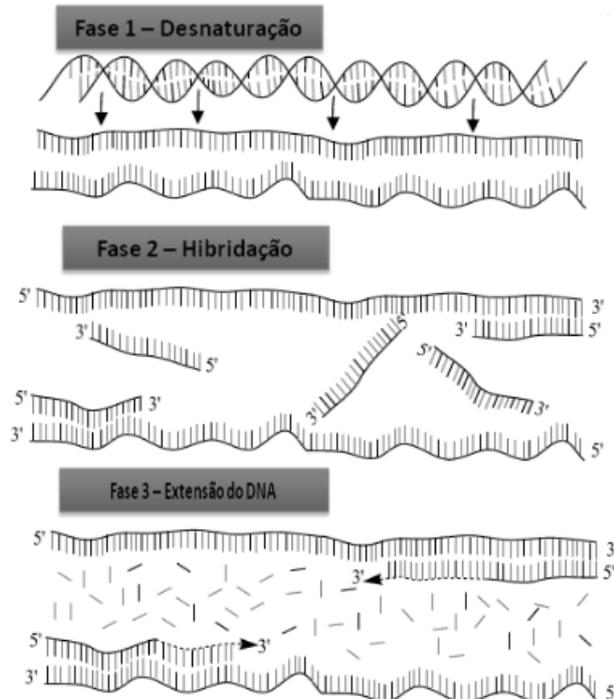


Figura 15 - Representação esquemática de um ciclo da técnica de PCR. Adaptado de: [106].

- *rt-PCR* (PCR em tempo real) – O procedimento desta técnica é semelhante ao descrito anteriormente. No entanto possibilita a quantificação em tempo real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação. Neste método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real [106].

- *Immunoblotting* – Esta técnica permite identificar e quantificar proteínas específicas a partir de uma mistura complexa de proteínas extraídas a partir de células. A técnica utiliza três elementos para realizar esta tarefa: (a) a separação das proteínas por tamanho a partir da electroforese em gel de prolicrilamida bi-dimensional, (2) a transferência das proteínas para um suporte sólido (geralmente membranas de nitrocelulose), e (3) a aplicação de um anticorpo (primário e secundário) adequado para identificar e permitir a quantificação da proteína alvo [107, 108].

Para uniformizar os métodos e comparar os seus resultados, as variáveis tais como o número de células, a fase de crescimento das células (período de frequência da sua replicação), tipo de célula, duração da exposição, o tamanho da amostra (isto é, geometria, densidade, forma e espessura) e a área de superfície da amostra, devem ser cuidadosamente controladas [32].

A avaliação biológica a partir das metodologias *in vitro* são fundamentais para o desenvolvimento de novos biomateriais. No entanto, esta avaliação não é suficiente, sendo extremamente importante a complementação destes resultados com outros ensaios (como a experimentação em animais - testes *in vivo* e ensaios clínicos) uma vez que, por exemplo, um óptimo desempenho *in vitro* pode não corresponder ao melhor desempenho *in vivo* [109].



# Capítulo 3

---

## Procedimiento Experimental



## 3. Procedimento Experimental

### 3.1. Materiais e células

Para a produção de grânulos de CaP, utilizou-se uma suspensão comercial de nanopartículas de HAp (nanoXIM, Fluidinova S.A) com diâmetro médio de partícula <50 nm, a uma concentração de 5% (peso/volume) e uma suspensão de fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) (Fluka) a 30% (peso/volume). Para produzir os grânulos atomizados, diluíram-se ambas as suspensões de modo a obter uma concentração de fosfatos de cálcio de 0,1% (peso/volume).

Para o fabrico dos *scaffolds* utilizou-se, para além dos grânulos atomizados, quitosano (Sigma-Aldrich), com grau de desacetilação de 80%, aproximadamente) e ácido acético (Merck, 100%) diluído a 0,2M. Como agente reticulante do quitosano, usou-se o glutaraldeído (Grade II 25% em H<sub>2</sub>O) da Sigma-Aldrich.

Para os ensaios de interação com células utilizaram-se células MG-63 (obtidas de osteossarcoma humano) (ATCC). Como meio de cultura foi utilizado o meio  $\alpha$ -MEM (Gibco), suplementado com soro bovino fetal (Gibco 10108-165), penicilina (Sigma-Aldrich), fungizona (Gibco) e ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). Nos procedimentos de caracterização das culturas celulares foram utilizados os seguintes reagentes: tripsina (Gibco), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich), *Alamar Blue* (Life Technologies), solução tampão de fosfato (PBS) estéril e não estéril (Gibco), Triton (Sigma-Aldrich), NaOH 5M (Sigma-Aldrich), glutaraldeído a 1,5% (Sigma-Aldrich) e cacodilato de sódio 0,14M (Sigma-Aldrich).

### 3.2. Métodos de Preparação

#### 3.2.1. Preparação dos grânulos de CaP

No âmbito deste trabalho, foram produzidos dois tipos de grânulos: grânulos de Hap e misturas bifásicas de  $\beta$ -TCP/HAp com razão mássica de 50/50. Para tal, prepararam-se suspensões aquosas com uma concentração de 0,1% (peso/volume) de HAp e de misturas bifásicas de  $\beta$ -TCP/HAp num volume total de 500mL.

O pó de  $\beta$ -TCP, antes de utilizado na atomização, foi moído num moinho planetário durante 48 horas por forma a obter-se um pó com distribuição granulométrica apertada e com tamanho médio de partícula  $\leq 1 \mu\text{m}$  [15].

Os grânulos foram obtidos a partir da atomização das suspensões de fosfato de cálcio num atomizador laboratorial *Mini Spray Dryer Bushi-191* (Figura 16), utilizando um bico de  $73 \mu\text{m}$ , uma bomba a 20%, um aspirador a 80% e uma temperatura de secagem no interior da câmara de atomização de  $180^\circ\text{C}$  (condições já optimizadas em trabalhos anteriores) [15, 110].

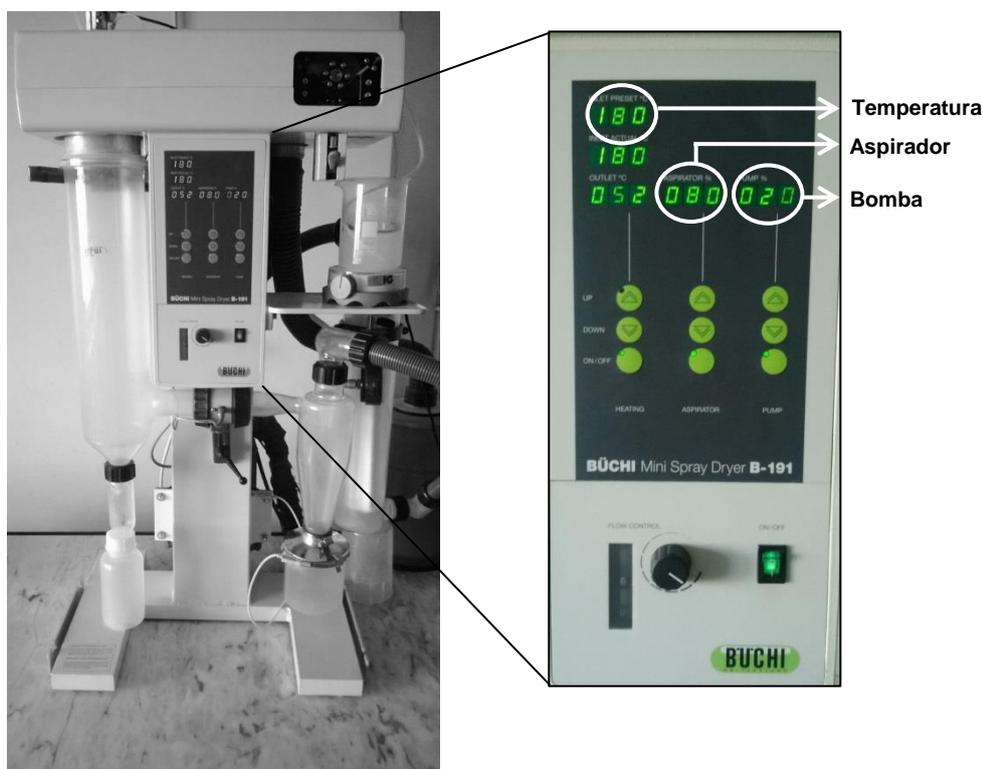


Figura 16 – Atomizador laboratorial *Mini Spray Dryer Bushi-191* e respectivas condições de utilização.

### 3.2.2. Preparação das matrizes de CH reticuladas e dos *scaffolds* compósitos

#### Matrizes de CH reticuladas

Preparou-se uma solução de quitosano, dissolvendo o CH numa solução de ácido acético 0,2M sob agitação e em condições de pH aproximadamente igual a 5, por forma a

obter uma solução polimérica com concentração de 2% [(massa de CH/ massa total de solução)\*100].

Numa tentativa de melhorar as propriedades mecânicas dos *scaffolds* compósitos, adicionaram-se à solução diferentes percentagens de glutaraldeído: 0,2%, 0,5%, 1%, 5% e 10% [%=(massa de GA/massa de polímero) x 100].

A solução resultante foi repartida por moldes cilíndricos com aproximadamente 10 ml de capacidade (Figura 17) que foram posteriormente colocados numa arca frigorífica a uma temperatura de -20°C durante um período mínimo de 24 horas.



Figura 17 – Moldes cilíndricos utilizados no fabrico dos *scaffolds*.

### Scaffolds compósitos

A solução de quitosano com reticulante é preparada da forma descrita anteriormente. Acrescentam-se os grânulos atomizados à solução enquanto esta ainda se encontra sob agitação. A quantidade de grânulos adicionados corresponde a uma razão de [2:1] de [quitosano: fosfatos de cálcio], obtendo-se uma suspensão com concentração mássica de 1% [(massa de grânulos/ massa total da suspensão)\*100].

Procedeu-se então à repartição da suspensão pelos moldes e à sua congelação em condições semelhantes às usadas para as matrizes de CH reticuladas.

As matrizes e os *scaffolds* compósitos foram posteriormente sujeitos a liofilização, colocando os moldes num liofilizador Labconco freeze DrySystem (Figura 18) com pressão  $12 \times 10^{-3}$  mbar e temperatura -52°C durante 4 dias por forma a remover o solvente por sublimação.



Figura 18 - Liofilizador Labconco freeze DrySystem.

Após esse período, as amostras foram sujeitas a um tratamento com etanol segundo o procedimento descrito por Madihally *et al.* [111] envolvendo os seguintes passos:

- 1) Mergulham-se os *scaffolds* em etanol absoluto durante 60 minutos;
- 2) Dilui-se o etanol para uma concentração de 70% (volume/volume). Os *scaffolds* permanecem nesta solução durante mais 30 minutos;
- 3) Por fim, volta-se a diluir a solução etanólica até 30% (volume/volume) e prolonga-se o tratamento durante mais 30 minutos.

Finalizado o tratamento em etanol, as amostras são imediatamente congeladas em azoto líquido (-196°C) e colocadas novamente no liofilizador por mais 24 horas.

Concluído o tempo de liofilização, retiraram-se as amostras dos moldes e colocaram-se num excicador para sua conservação e posterior caracterização.

### 3.2.3. Preparação das membranas compósitas

As suspensões necessárias à preparação das membranas compósitas foram preparadas seguindo o mesmo procedimento referido na secção anterior. Cada suspensão foi depositada, por sua vez, em cima de uma lâmina sobre uma placa de Petri e posteriormente colocada sob vácuo durante duas horas por forma a remover grande parte das bolhas formadas na solução durante a agitação.

Colocaram-se então as membranas a secar numa estufa a 40°C durante 24 horas. Forma-se assim uma membrana sobre a lâmina que se desloca da placa de Petri e se conserva num excicador.

### 3.3. Caracterização

#### 3.3.1. Caracterização dos grânulos de CaP

Os grânulos preparados por atomização foram caracterizados quanto à área superficial específica, composição de fases cristalinas e morfologia.

A área superficial específica foi determinada com a ajuda do equipamento Micromeritics Gemini 2370 V5.00 (Norcross, USA) por adsorção física de azoto, usando a isotérmica de adsorção Brunauer, Emmett e Tellerum (BET).

Os grânulos foram também analisados por difracção de Raio-X (DRX) num difratómetro Rigaku Geigerfle D/Max-SérieC, equipado com um monocromador curvo de grafite, com uma voltagem de 40 kV e uma corrente de 30 mA, usando a radiação  $K\alpha$  ( $\lambda=1,54056 \text{ \AA}$ ), de modo a poder identificar as fases cristalinas dos diferentes pós.

A análise morfológica dos grânulos de CaP foi efectuada por microscopia electrónica de varrimento (SEM), num microscópio HITACHI, modelo S-4100 provido de um sistema de emissões de electrões com um filamento de tungsténio com potencial de aceleração de 10 kV e resolução máxima de 15  $\text{\AA}$ .

Para preparação das amostras para microscopia electrónica, fixou-se fita-cola de dupla face de num porta-amostras de alumínio sobre a qual se dispersou uma pequena quantidade de pó. Ambas as amostras foram revestidas com um filme fino de carbono depositado no equipamento EMITECH K950.

#### 3.3.2. Caracterização dos scaffolds

Os *scaffolds* produzidos neste trabalho foram caracterizados quanto à sua microestrutura e resistência mecânica à compressão.

A microestrutura foi observada por microscopia electrónica de varrimento (SEM) usando o mesmo microscópio referido na secção 3.3.1. Para observação das amostras, foram realizados cortes transversais nos diferentes *scaffolds* e posteriormente fixadas com cola de dupla face de carbono em porta-amostras de alumínio. As amostras foram revestidas com um filme de carbono obtido no depositador de carbono (EMITECH K950).

A partir das micrografias obtidas e com a ajuda do programa *ImageJ* 1.45, foram medidas as áreas dos poros em determinadas amostras (Figura 19).

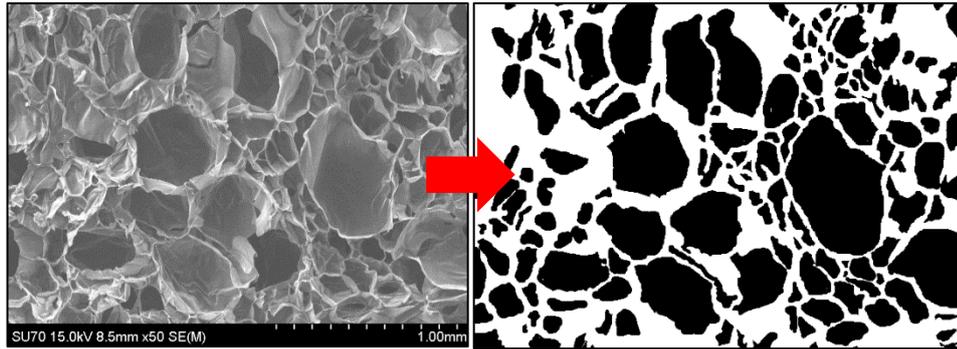


Figura 19 - Cálculo da área dos poros usando o *ImageJ* 1.45.

As micrografias sofrem um tratamento de imagem, gerando-se uma imagem binária onde as formas pretas correspondem aos poros, sendo a área de cada poro calculada automaticamente. Para este processo, foram utilizadas três imagens com a mesma amplificação para cada amostra, o que corresponde a cerca de 300 poros.

Gerados os valores das áreas dos poros foi calculado o diâmetro equivalente e a distribuição de tamanho dos mesmos.

Nos casos em que não se evidenciavam grandes variações no tamanho do poro, foi calculado apenas o tamanho médio do poro com o mesmo programa. Usando imagens SEM, fizeram-se medições em todos os poros das imagens, avaliando-se os seus diâmetros em diferentes direções, uma vez que os poros não apresentam uma secção recta perfeitamente circular (Figura 20). Esta metodologia já foi utilizada de um modo semelhante em trabalhos anteriores [110].

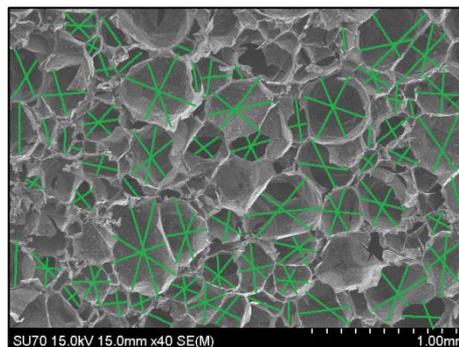


Figura 20 - Cálculo do tamanho médio dos poros usando o *ImageJ* 1.45.

O conjunto de valores medido foi usado para cálculo do diâmetro, da média e do desvio padrão das diferentes amostras.

Os diferentes *scaffolds* compósitos foram também submetidos a ensaios de compressão para avaliação do módulo de Young e da resistência mecânica à compressão. Para isso, utilizou-se um equipamento universal de ensaios mecânicos

Zwick/Roell Z020 (Figura 21), com velocidade de aplicação de carga de 1 mm/min e uma célula de carga 20 KN.

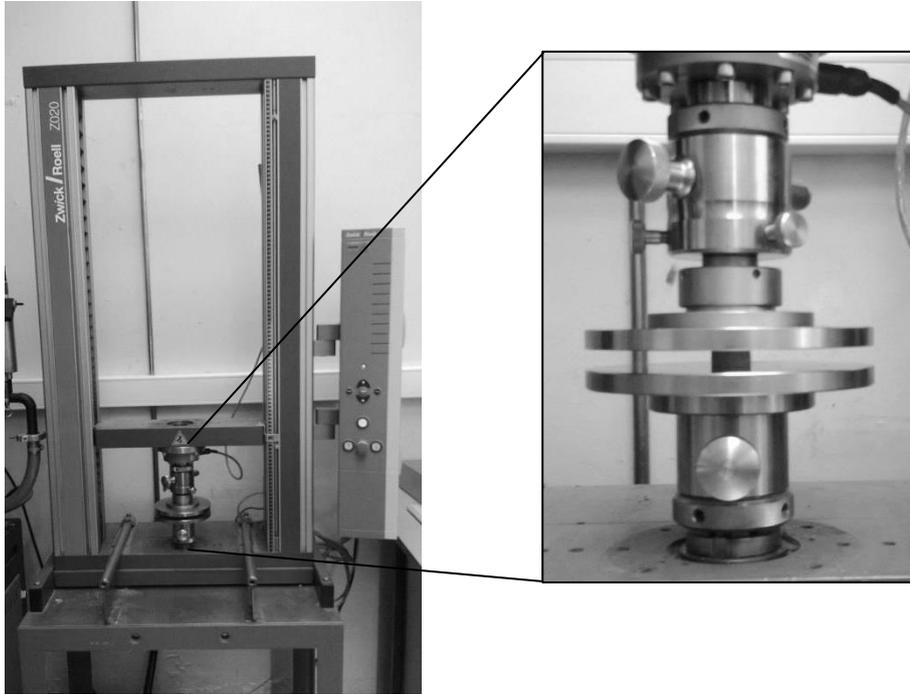


Figura 21 - Equipamento de ensaios mecânicos Zwick/Roell Z020 e respectiva célula de carga utilizada.

Os ensaios foram realizados em três amostras de *scaffolds* preparados nas mesmas condições até se obter uma deformação de cerca de 50%. Com a ajuda do programa de aquisição de dados “testXpert”, efectuou-se o registo simultâneo da força e do deslocamento do prato. Com esses dados, construíram-se as respectivas curvas de tensão-deformação para cada tipo de *scaffold*, que descrevem o comportamento do material ao longo do ensaio.

A tensão mede a força por unidade de área e calcula-se através do quociente entre a força aplicada e a área da secção transversal à direcção de aplicação da força, usando a seguinte expressão:

$$\sigma \text{ (MPa)} = \frac{F}{A}$$

onde  $\sigma$  é a tensão de compressão resultante,  $F$  é a força de compressão uniaxial e  $A$  é a área inicial da superfície que suporta a força aplicada.

A deformação do material ( $\varepsilon$ ) é expressada pelo quociente entre a variação da altura ( $\Delta h$ ) e a altura inicial da amostra ( $h_0$ ):

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h_0}$$

### 3.3.3. Caracterização das membranas compósitas

As membranas compósitas foram caracterizadas quanto à sua rugosidade e molhabilidade.

Um dos parâmetros mais importantes para a caracterização da superfície é a rugosidade das membranas. Na avaliação deste parâmetro, utilizou-se um perfilómetro – Perthometer M1, Mahr (Figura 22), que permite fazer medições de rugosidade em diferentes pontos das membranas, varrendo um comprimento de 5,6mm.

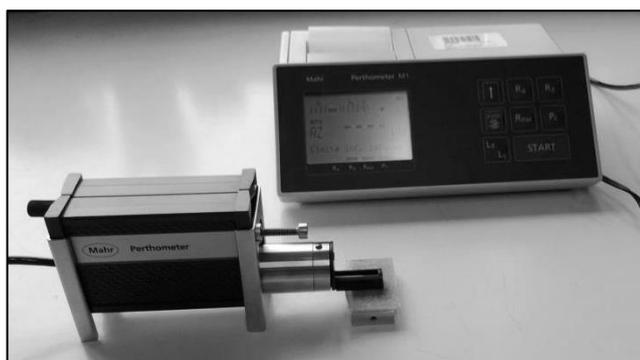


Figura 22 - Perfilómetro (Perthometer M1, Mahr) utilizado nas medições de rugosidade das membranas.

Este aparelho permite a quantificação da rugosidade média ( $R_a$ ). Para cada membrana realizaram-se oito medições para obter a média de cada parâmetro.

As membranas foram também caracterizadas por SEM para análise da sua morfologia e espessura, usando o mesmo microscópio electrónico de varrimento referido na secção 3.3.1.

De forma a poder ter-se uma percepção de quão hidrofílica ou hidrofóbica é a superfície do *scaffold*, produziram-se membranas com a mesma composição dos *scaffolds* compósitos e mediram-se os respectivos ângulos de contacto. Estes foram mensurados com o aparelho de medição de ângulos de contacto Dataphysics – *contact angle sistem* OCA (Figura 23) que depositava uma gota de água de 1,5  $\mu$ l sobre a superfície da membrana.

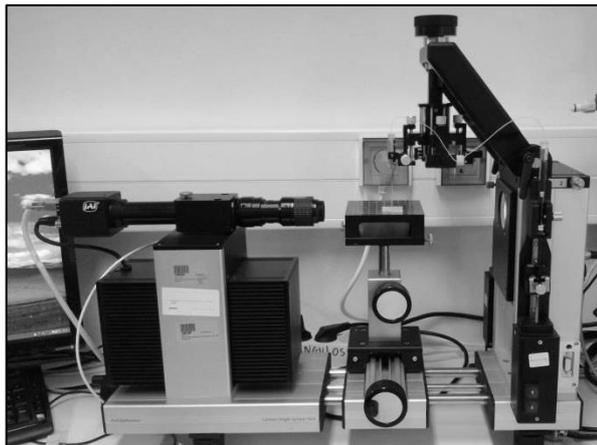


Figura 23 - Aparelho de medição de ângulos de contacto Dataphysics – *contact angle sistem OCA*.

Com a ajuda do software SCA20, mediram-se os ângulos de contacto para  $t=0$  (ou seja, o ângulo de contacto considerado foi o primeiro valor obtido pelo aparelho). Registaram-se também os valores dos mesmos ao longo do tempo (aproximadamente 50 s), repetindo-se sete medições para cada membrana.

### 3.4. Estudos de citocompatibilidade dos *scaffolds*

Os *scaffolds* foram submetidos a ensaios de interacção com células para caracterizar a sua resposta biológica, nomeadamente a viabilidade celular/proliferação, adesão, morfologia celular e funcionalidade. Todo este trabalho foi realizado no Laboratório de Metabolismo e Regeneração Óssea da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Todos os materiais submetidos a estes ensaios foram esterilizados por radiações UV num período mínimo de 12 horas.

A população celular utilizada foi a linhagem celular MG-63 (ATCC), obtida de osteossarcoma humano. Esta linha celular apresenta características fenotípicas semelhantes às populações osteoblásticas, nomeadamente a expressão de elevados níveis de fosfatase alcalina, osteocalcina, colagénio tipo I e osteoprotegerina (marcadores específicos do fenótipo osteoblástico). Esta linha celular é frequentemente utilizada na avaliação da citotoxicidade de biomateriais que visam o contacto com o tecido ósseo [112-114].

### 3.4.1. Estabelecimento e manutenção das culturas celulares

As células MG-63 foram cultivadas em placas de culturas *standard* num meio de cultura composto por  $\alpha$ -*Minimum Essential Medium* ( $\alpha$ -MEM, GIBCO) suplementado com 10% (volume/volume) de soro bovino fetal (Gibco® 10108-165), penicilina-estreptomicina (100 UI/ml e 100  $\mu$ g/ml, respectivamente), fungizona (2,5 mg/ml), ácido ascórbico (50  $\mu$ g/mL), à temperatura de 37°C e em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para realização das experiências, as células aderidas foram enzimaticamente libertadas com a ajuda de uma solução de tripsina a 0,05% (massa/volume) e 0,5 mM EDTA durante aproximadamente 10 minutos. A acção da tripsina foi então interrompida com a adição de meio completo, obtendo-se uma suspensão com células cuja concentração foi determinada num hematocítómetro (Nihon Koheden®, Celltac MEK-5103K). Entretanto, as amostras dos diferentes *scaffolds* foram introduzidas em placas com 48 poços, com 1 ml de meio completo em cada poço e incubaram durante 30 minutos.

Seguidamente removeu-se o meio de cultura de cada poço e introduziu-se a suspensão celular ( $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>), em meio de cultura com a composição acima descrita. As células foram incubadas nas mesmas condições de cultura referidas anteriormente.

### 3.4.2. Caracterização das culturas celulares

As culturas celulares foram avaliadas quanto à sua viabilidade/proliferação celular (ensaio da resazurina), à actividade enzimática da fostatase alcalina e foram observadas a nível da sua morfologia celular e adesão (por microscopia electrónica de varrimento).

#### 3.4.2.1. Viabilidade/proliferação celular (Resazurina)

A resazurina, conhecida comercialmente por *Alamar Blue*, é utilizada como um indicador de oxidação-redução que permite a avaliação da actividade metabólica das células viáveis. A sua forma oxidada apresenta-se não fluorescente com uma coloração azul. Este composto pode ser reduzido, pelas células viáveis, a resofurina, de cor rosa e

fluorescente. Esta mudança de cor do meio de cultura é posteriormente medida pela determinação da fluorescência emitida e é proporcional à actividade metabólica das células viáveis em cultura.

Para realizar a experiência, removeu-se o meio às culturas e adicionou-se novo meio com resazurina (10 µg/ml) a cada poço. As placas foram de seguida incubadas durante 3 horas (à temperatura de 37°C e em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>) para permitir condições óptimas de oxidação-redução. A redução da resazurina foi determinada pela medição de fluorescência ( $\lambda_{\text{ex}}= 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}= 590 \text{ nm}$ ) num leitor de ELISA (Synergy HT, Biotek). O valor do controlo (*scaffolds* mantidos em meio de cultura sem adição de células) foi subtraído. Em cada tempo de cultura, cada material foi testado em triplicado.

#### 3.4.2.2. Actividade da Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é uma proteína com actividade enzimática capaz de remover grupos fosfato de um grande número de moléculas diferentes em ambiente alcalino, resultando na formação de um radical fosfato orgânico e inorgânico.

Em aplicações da engenharia de tecido ósseo é importante a avaliação desta enzima, uma vez que esta se encontra em elevadas quantidades no tecido ósseo, secretada essencialmente pelos osteoblastos, sendo um componente importante na osteogénese. A síntese da ALP é um marcador característico da diferenciação dos osteoblastos, sendo a sua actividade essencial para o início da mineralização da osteóide [115, 116].

Para detectar a actividade desta enzima, sabe-se que esta catalisa a transferência do grupo fosfato do substrato p-nitrofenilfosfato (p-NFF) para o 2-Amino-2-Metil-1-Propanol (AMP), formando o p-nitrofenol de acordo com a equação abaixo:



A velocidade de libertação do p-Nitrofenol, que possui elevada absorvância a 405nm numa solução tampão alcalina, é assim proporcional à actividade enzimática da fosfatase alcalina da amostra.

Após um tratamento das culturas com Triton a 0,1%, deu-se a lise das células mantendo-se a conformação estrutural da maioria das proteínas. A actividade da ALP foi, assim, analisada por determinação colorimétrica do produto do p-nitrofenol a  $\lambda=400 \text{ nm}$  num leitor de ELISA (Synergy HT, Biotek). A hidrólise do fosfato p-nitrofenil (pH 10,3) foi

realizada durante 60 minutos a 37°C que posteriormente foi interrompida com a adição de NaOH 5M. A actividade da ALP de cada amostra foi normalizada para a sua concentração de proteína e os resultados foram expressos em nanomoles de p-nitrofenol produzido por minuto por  $\mu\text{g}$  de proteína ( $\text{nmol}/\text{min}^{-1} \mu\text{g} \text{ proteína}^{-1}$ ). A quantificação da proteína total foi realizada pelo método de Lowry.

#### **3.4.2.3. Avaliação da adesão e morfologia celular por microscopia electrónica de varrimento (SEM)**

Para avaliar a adesão e detectar possíveis alterações na morfologia das células MG-63 cultivadas sobre os diferentes *scaffolds*, recorreu-se à observação das micrografias obtidas por SEM. Para isso, as culturas foram inicialmente fixadas com glutaraldeído a 1,5% durante 10 minutos, lavadas com PBS e mantidas numa solução tampão de cacodilato de sódio 0.14M. As amostras foram desidratadas em diferentes concentrações de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), por 10 minutos. Para simular a secagem ao ponto crítico, as amostras foram incubadas por 10 minutos em diferentes concentrações de hexametildisilazano (50%, 60%, 70%, 90%, 100%, em álcool). Seguidamente, foram revestidas com filme fino de Au/Pd, por pulverização catódica (*sputtering*), utilizando o equipamento SPI Module Sputter Coater. O exame SEM / EDS foi realizado utilizando o Microscópio Electrónico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky), com Microanálise por Raios X e Análise de Padrões de Difracção de Electrões Retrodondidos: Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M.

#### **3.4.2.4. Análise estatística**

Os resultados apresentados relativamente à caracterização biológica com culturas celulares resultam da realização de 3 experiências independentes. Nos testes bioquímicos (Resazurina e actividade da fosfatase alcalina), cada valor representa a média e o desvio padrão de 5 ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com recurso à análise de variância (ANOVA one-way), tendo sido considerados significativos os resultados com  $p \leq 0,05$ .

# Capítulo 4

---

## Resultados e Discussão



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Caracterização dos grânulos de CaP

Foram obtidos por atomização grânulos de HAp,  $\beta$ -TCP e da mistura de ambos (mistura bifásica) [(massa de HAp/massa de  $\beta$ -TCP)=1].

Segundo a literatura, materiais granulares de fosfato de cálcio demonstraram potencialidade para substituição do osso, por serem fáceis de implantar e por estabelecerem uma óptima biocompatibilidade e osteocondutividade [117].

A Figura 24 apresenta as imagens obtidas por SEM das partículas da suspensão inicial de HAp (comercial) e do respectivo pó atomizado.

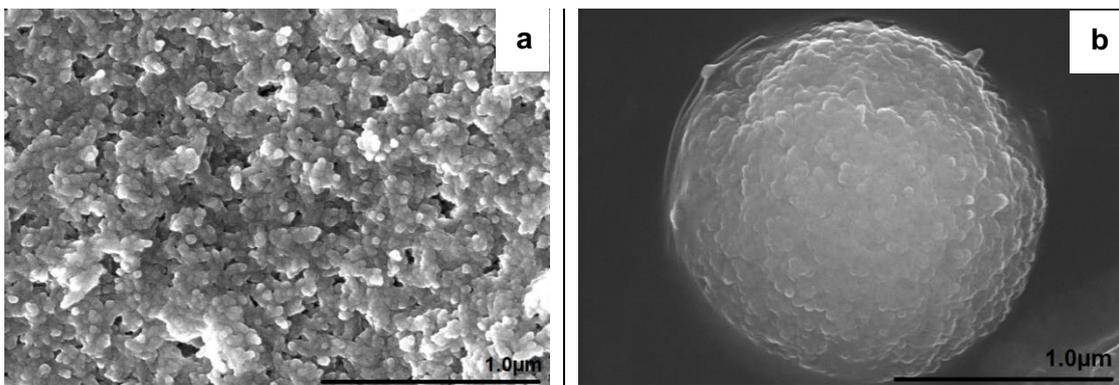


Figura 24 - Imagens SEM de HAp: a) partículas da suspensão inicial de HAp e b) grânulos de HAp atomizados.

Pode-se observar, através da micrografia da Figura 24 (a), que as partículas da suspensão inicial apresentam um tamanho nanométrico, com tamanho médio de 0,058  $\mu\text{m}$  e com uma distribuição uniforme. Observa-se também que os grânulos formados por atomização são micrométricos com uma forma esférica e cerca de 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio, o que é indicativo de uma aglomeração das nanopartículas iniciais durante a atomização.

A Figura 25 apresenta as micrografias obtidas por SEM das partículas da suspensão inicial de  $\beta$ -TCP e do respectivo pó após a atomização.

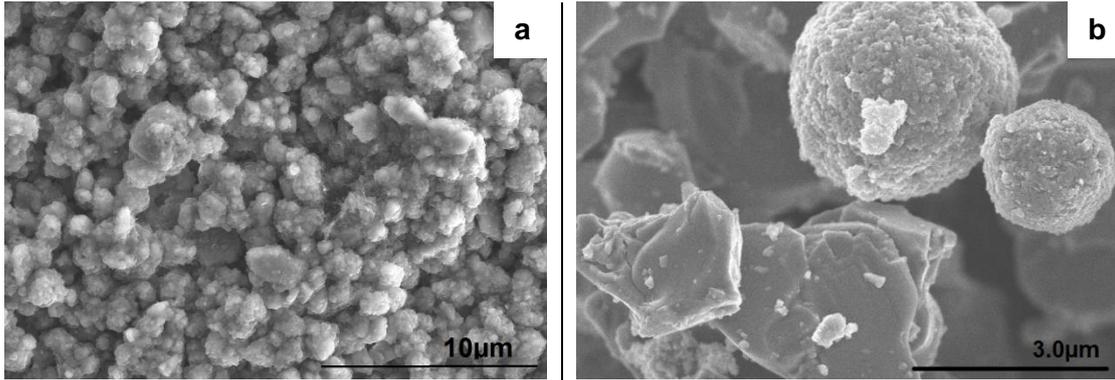


Figura 25 - Imagens SEM de  $\beta$ -TCP: a) partículas da suspensão inicial de  $\beta$ -TCP e b) grânulos de  $\beta$ -TCP atomizados.

As partículas da suspensão inicial de  $\beta$ -TCP apresentam-se com dimensões consideravelmente maiores do que as das partículas iniciais de HAp e com o tamanho não uniforme. Com a atomização, dá-se uma agregação das partículas, obtendo-se grânulos de tamanhos também irregulares, com uma formas esféricas assimétricas (Figura 25b).

Na Figura 26 pode comparar-se a morfologia das partículas da mistura bifásica com a do pó após atomização.

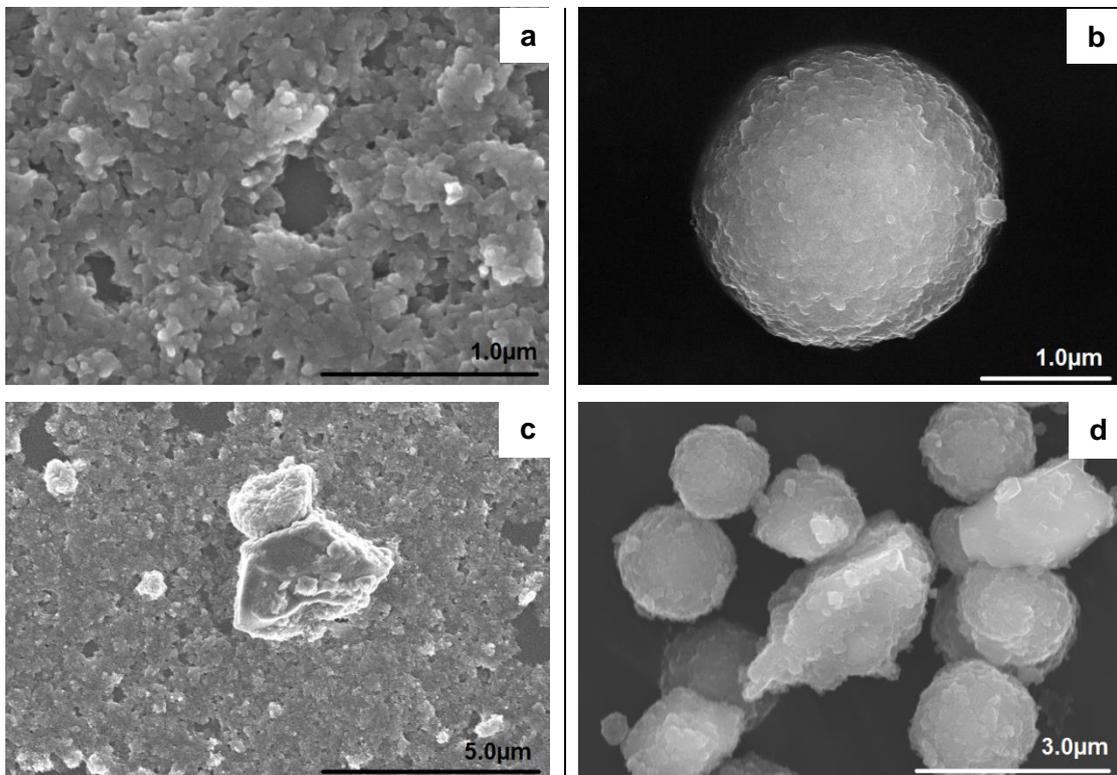


Figura 26 - Imagens SEM de misturas bifásicas: a) e c) partículas da suspensão bifásica inicial e b) e d) grânulos bifásicos atomizados.

Detecta-se na mistura inicial bifásica a presença das partículas nanométricas de HAp e a das partículas de  $\beta$ -TCP que são um pouco maiores e com uma forma mais irregular. A junção destes dois tipos de partículas originou, após atomização, grânulos bifásicos com uma forma esférica menos regular do que a dos grânulos de HAp e com tamanho maior e menos uniforme.

A Tabela 6 apresenta as áreas superficiais específicas dos vários pós, antes e após atomização.

**Tabela 6 - Áreas superficiais específicas obtidas por BET das diferentes partículas antes e depois de atomizadas (grânulos).**

Suspensões de CaP	Área Superficial Específica das partículas da suspensão inicial (BET) (m <sup>2</sup> /g)	Área Superficial Específica dos grânulos (BET) (m <sup>2</sup> /g)
HAp	124	106
$\beta$ -TCP	48	17
Bifásicos HAp + $\beta$ -TCP (50:50)	65	60

Ao observar os resultados obtidos, verifica-se uma certa diferença entre as áreas das partículas iniciais e as dos grânulos. As áreas superficiais específicas das partículas da suspensão inicial de HAp e de  $\beta$ -TCP são relativamente maiores do que as áreas superficiais dos respectivos grânulos atomizados, o que sugere tratar-se de uma agregação com perda de superfície.

As partículas bifásicas da suspensão inicial apresentam uma área superficial intermédia entre a da HAp e do  $\beta$ -TCP. A área superficial específica do seu pó atomizado é semelhante à do pó inicial, o que indica tratar-se de uma agregação leve com pouca perda de superfície.

As fases cristalinas dos grânulos atomizados foram identificadas por difracção de raio-X, apresentando-se na Figura 27 os difractogramas obtidos.

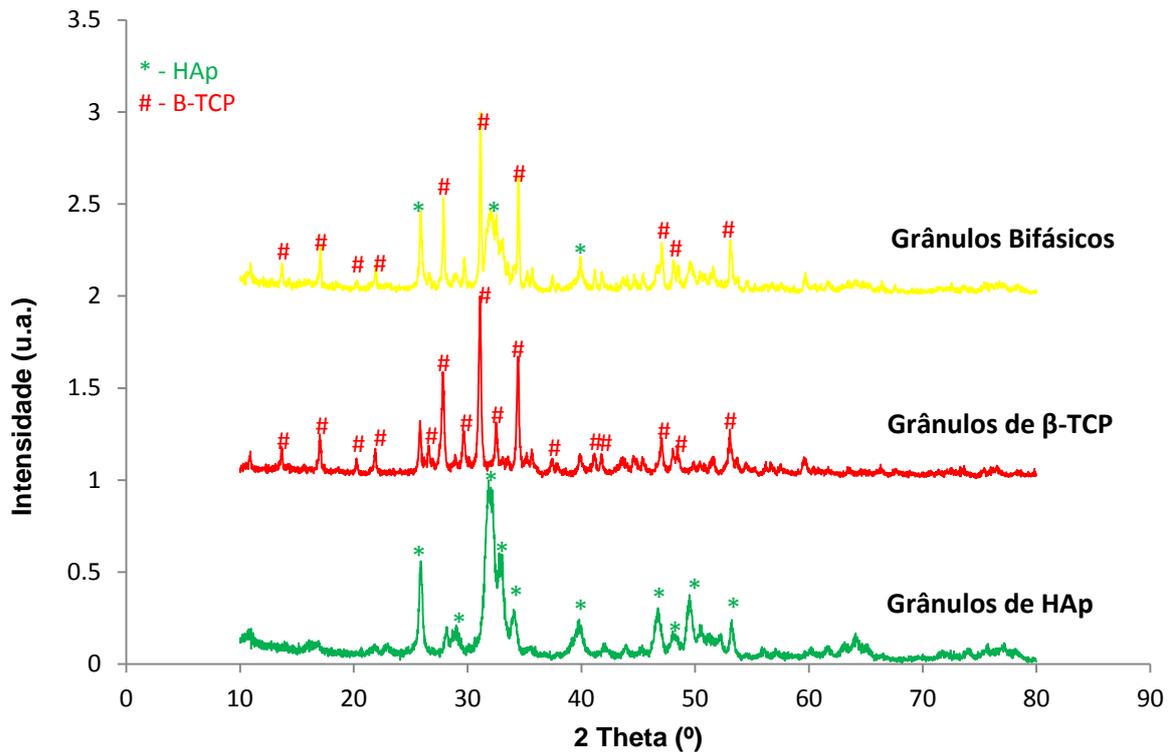


Figura 27 - Difractograma de raio-X dos grânulos de HAp,  $\beta$ -TCP e dos grânulos Bifásicos, obtidos por atomização

Os resultados apresentados revelam que, no caso da HAp atomizada, todos os picos correspondem à fase cristalina da HAp, sendo este difractograma idêntico ao das nanopartículas usadas na suspensão inicial, o que indica que a cristalinidade da HAp não sofreu alteração durante o processo de atomização. O mesmo se verifica no difractograma do  $\beta$ -TCP, onde se detecta também apenas a fase cristalina deste material. No caso do DRX dos grânulos bifásicos, observa-se a presença de picos correspondentes tanto à HAp como ao  $\beta$ -TCP, o que está de acordo com o facto de se tratar de uma mistura bifásica de ambos.

No presente trabalho, utilizaram-se apenas os grânulos de HAp e grânulos da mistura bifásica entre  $\beta$ -TCP e HAp (proporção mássica 50:50) para o fabrico dos *scaffolds* uma vez que são os que apresentam uma morfologia mais adequada. Este é um parâmetro que deve ser seleccionado cuidadosamente e, segundo a literatura, a forma esférica (conseguida nos grânulos de HAp e bifásicos) tem sido recomendada para evitar processos inflamatórios e melhorar a osteointegração [118, 119].

Na Figura 28 apresentam-se as imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento dos dois tipos de grânulos atomizados utilizados no presente trabalho.

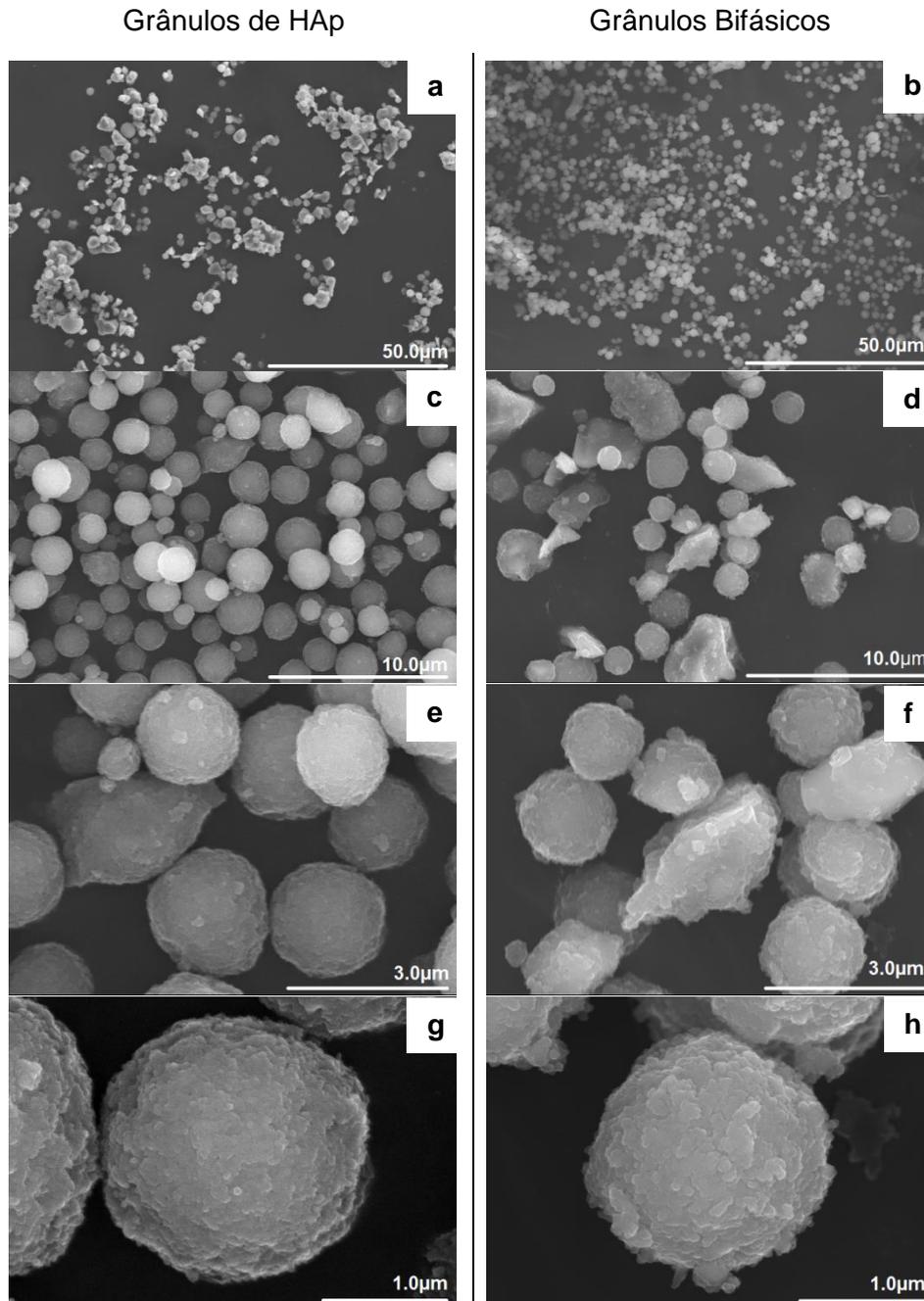


Figura 28 - Micrografias de SEM dos grânulos: a), c), e) e g) de HAp e b), d), f) e h) bifásicos.

Comparando as imagens, verifica-se que os grânulos de HAp apresentam uma morfologia esférica, com ligeiras irregularidades à superfície, ao passo que os grânulos bifásicos exibem maiores irregularidades, que tornam a sua superfície menos esférica. Como se viu anteriormente, os grânulos de  $\beta$ -TCP após atomização apresentam uma

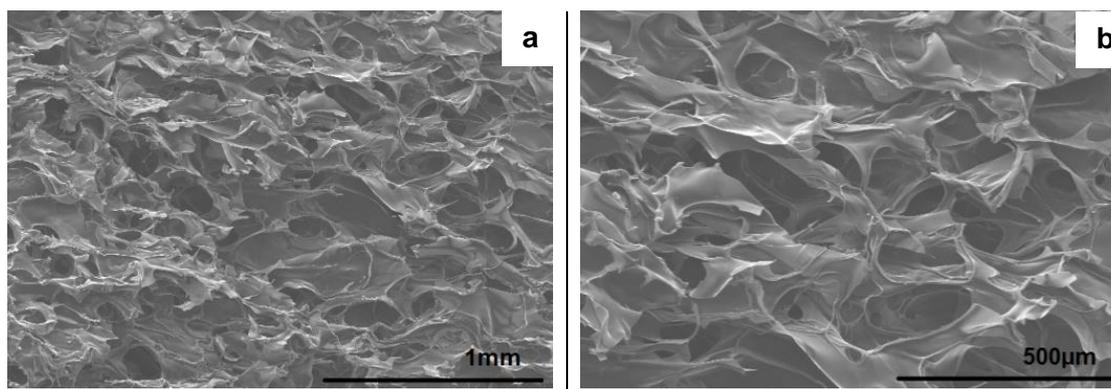
forma bastante irregular. Deste modo, quando o  $\beta$ -TCP é atomizado conjuntamente com a HAp, formam-se grânulos esféricos mais regulares do que os do  $\beta$ -TCP, embora menos perfeitos do que os de HAp. Superfícies com irregularidades ou rugosidades como as dos grânulos obtidos no presente trabalho têm sido recomendadas uma vez que favorecem a adesão celular [120, 121].

## 4.2. Caracterização das matrizes de CH reticuladas

Os *scaffolds* de quitosano com grânulos de fosfato de cálcio já estudados em trabalhos anteriores apresentavam ainda algumas limitações ao nível da resistência mecânica. Tornou-se, assim, necessário implementar uma medida que melhorasse o comportamento mecânico do *scaffold*, de modo a que este se aproximasse ao comportamento do osso.

Incorporou-se na matriz polimérica um agente reticulante, o glutaraldeído (GA), capaz de formar ligações com os grupos amina do quitosano, conferindo rigidez à estrutura final do *scaffold*. A taxa de reticulação do glutaraldeído está dependente da sua concentração, do pH e da temperatura [122]. Adicionaram-se pois diferentes quantidades de glutaraldeído à composição (0,2%, 0,5%, 1%, 5% e 10%) de modo a estudar a influência da concentração nas propriedades mecânicas, na morfologia e na resposta celular.

O *scaffold* de quitosano resultante da liofilização de uma solução congelada de quitosano em ácido acético é, na verdade, um sal de quitosano com iões de acetato ligados quimicamente aos grupos amina que é bastante solúvel em água [111]. Macroscopicamente os *scaffolds* de quitosano apresentam uma estrutura flexível e esponjosa. Nas imagens que se seguem (Figura 29), é possível observar a microestrutura das matrizes de quitosano.



**Figura 29 - Micrografias de SEM de scaffolds de CH.**

As micrografias de SEM revelam a existência de poros interconectados, com um tamanho médio de poro situado entre 50 a 200 µm.

Na Figura 30 apresenta-se as micrografias dos scaffolds de CH com as diferentes percentagens de reticulante.

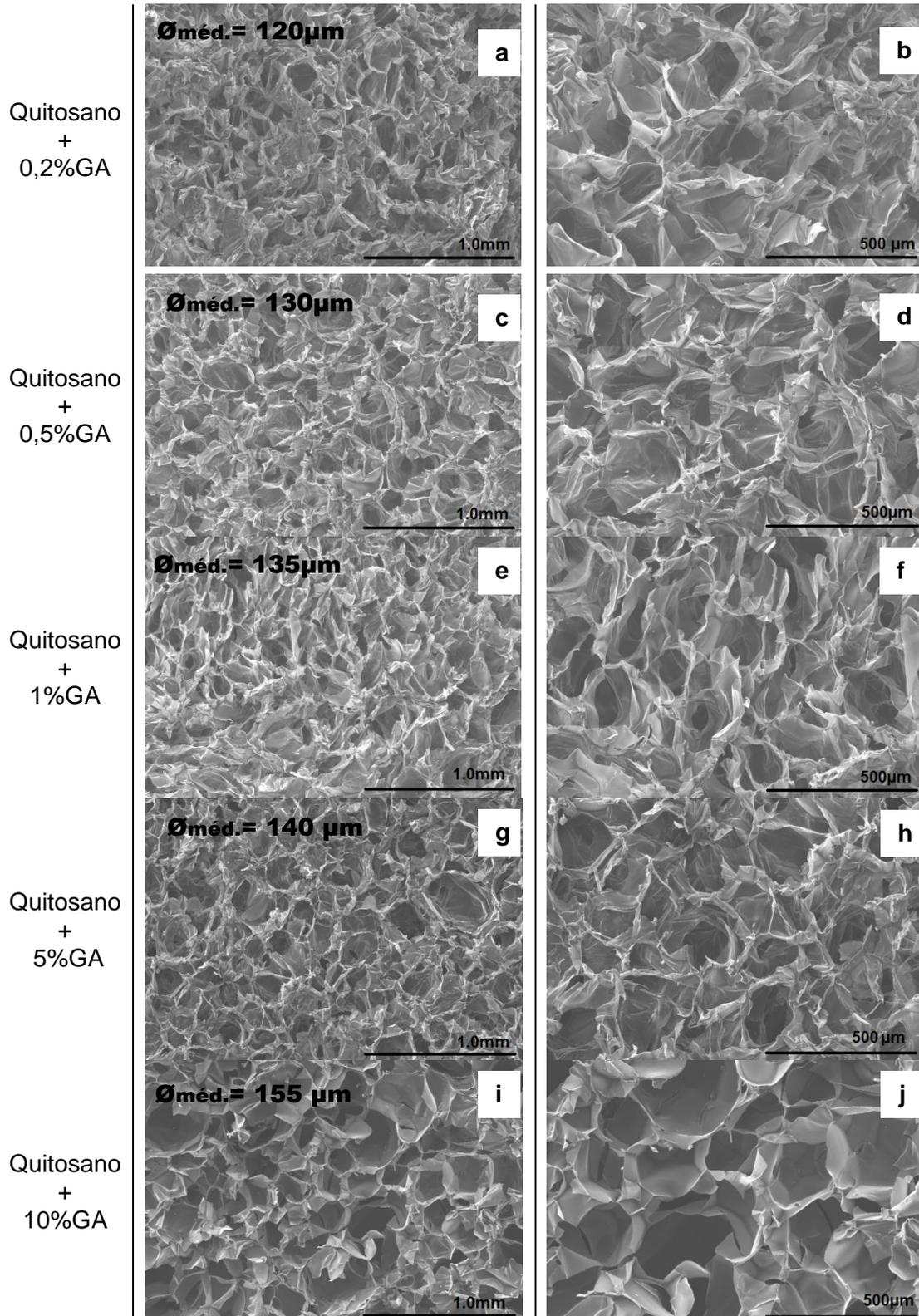


Figura 30 - - Micrografias de SEM dos scaffolds de quitosano com a adição de diferentes teores de glutaraldeído e respectivos valores para o tamanho médio de poro: 0,2% (a, b); 0,5% (c, d); 1% (e, f); 5% (g, h) e 10%(i, j).

Observa-se que a adição de glutaraldeído não altera significativamente a estrutura de poros, mantendo-se a boa interconectividade dos mesmos. Relativamente à porosidade, as micrografias revelam que o tamanho médio de poro não se altera significativamente para os baixos teores de reticulante. Para o teor de 10%, o tamanho médio de poro é claramente superior ao observado nos casos em que o teor de glutaraldeído é inferior.

O comportamento mecânico das diferentes estruturas de quitosano foi avaliado através de ensaios de compressão. A Figura 31 apresenta as diferentes curvas de tensão-deformação obtidas.

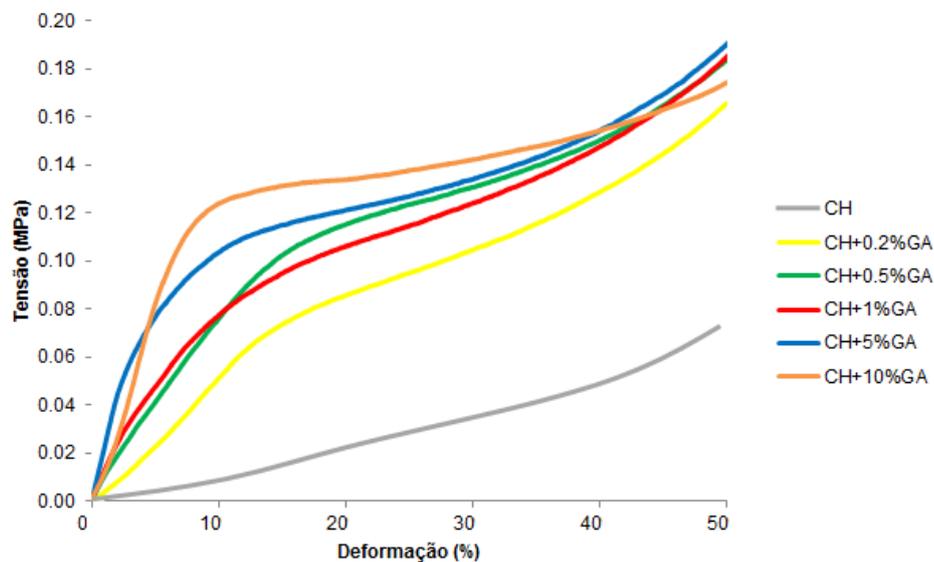


Figura 31 - Comportamento mecânico dos scaffolds de quitosano com a adição de diferentes percentagens de glutaraldeído.

Pela análise da figura pode-se verificar que a adição de GA aumenta claramente a resistência dos *scaffolds* à compressão. Pode verificar-se que para os *scaffolds* de quitosano não reticulado se obtiveram valores de resistência à compressão de aproximadamente 0,08 MPa para uma deformação de 50%. Este valor é comparável com valores obtidos por Zhang *et al.* [123], os quais também produziram *scaffolds* de CH em condições comparáveis às do presente trabalho (2% de CH em 0,2% de ácido acético), os quais obtiveram valores de resistência à compressão na ordem dos 0,11 MPa para uma deformação de 60%. Como reportado [42, 46], o glutaraldeído reage com o quitosano, tornando a estrutura mais rígida e mecanicamente mais resistente. Através das curvas de tensão-deformação apresentadas, verifica-se que à medida que se

aumenta a concentração de GA, os *scaffolds* vão exibindo melhores propriedades mecânicas, o que indica uma intensificação de ligações entre o GA e o quitosano. *Scaffolds* com 1, 5 e 10% de GA são os que suportam cargas maiores, a rondar os 0,19 MPa.

A partir das curvas tensão-deformação, calcularam-se os respectivos módulos de Young para os diferentes *scaffolds* (Tabela 7). O módulo de Young corresponde à inclinação inicial da curva, ou seja, ao declive da tangente à parte inicial da curva.

**Tabela 7 - Módulos de Young dos *scaffolds* de quitosano com os diferentes teores de GA.**

<i>Scaffolds</i>	Módulo de Young (MPa)
CH	0,27
CH+0,2%GA	0,53
CH+0,5%GA	0,76
CH+1%GA	0,84
CH+5%GA	1,73
CH+10%GA	1,7

Como seria de esperar, através da observação das curvas de tensão-deformação obtidas, verifica-se também um aumento progressivo do módulo de Young à medida que se aumenta o teor do agente de reticulação, o que traduz uma rigidez cada vez maior por parte dos *scaffolds*.

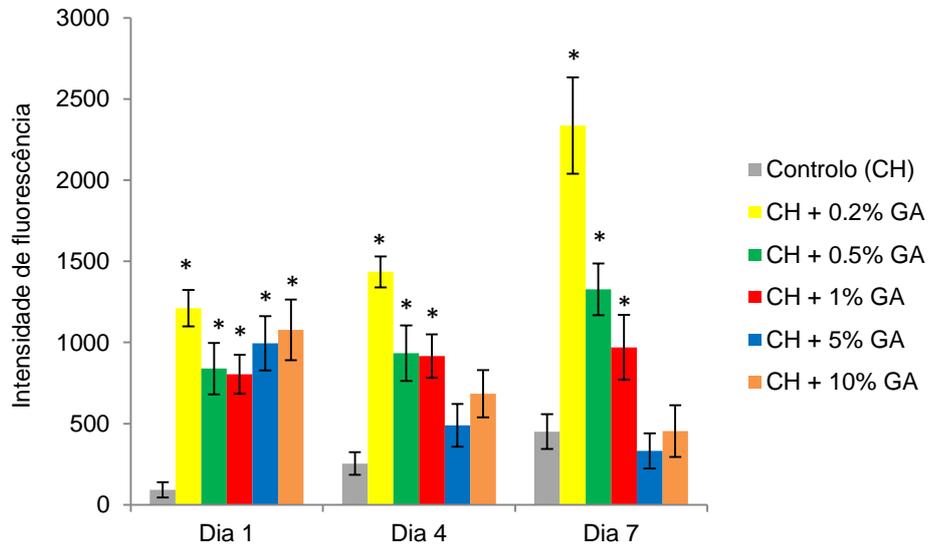
Quando se eleva a concentração de GA de 5% para 10%, não se verificam diferenças significativas no módulo de Young, o que pode indicar que o grau de reticulação desses *scaffolds* não se alterou substancialmente, maximizando-se a reticulação com percentagens de GA a rondar os 5%.

Apesar das concentrações mais elevadas de GA serem as que conduzem às melhores propriedades mecânicas, é fundamental que o GA não prejudique a biocompatibilidade dos biomateriais reticulados.

Para estudar esse comportamento, submeteram-se, então, os *scaffolds* a ensaios celulares de viabilidade e proliferação celular por forma a seleccionar as concentrações mais indicadas para serem utilizadas na fabricação dos *scaffolds*.

A viabilidade e a proliferação celular foram avaliadas através do método da resazurina, definindo-se como controlo os *scaffolds* de quitosano sem adição de GA.

Na Figura 32 pode observar-se a actividade metabólica das culturas estabelecidas nos diferentes *scaffolds* mantidas durante 1, 4 e 7 dias.



**Figura 32 – Actividade metabólica das culturas estabelecidas nos diferentes *scaffolds* de quitosano sem e com as diferentes percentagens de GA, ensaio da resazurina. \* Diferença estatisticamente significativa comparativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ).**

Pode observar-se, através da análise da Figura 32, que o material controlo (*scaffold* de CH sem GA) permite a adesão e proliferação das células ao longo do tempo, apesar do valor obtido ao dia 1 ser significativamente inferior ao dos restantes *scaffolds* avaliados.

A adição do glutaraldeído na composição dos *scaffolds* melhorou significativamente o desempenho biológico relativamente ao controlo. Em todas as condições com GA verificou-se uma melhor adesão celular, justificada pelo aumento dos valores da actividade metabólica ao dia 1.

Nos *scaffolds* reticulados com uma baixa concentração de GA, verificou-se uma evidente proliferação das células ao longo dos 7 dias de cultura, particularmente nos *scaffolds* com 0,2% e 0,5% de GA. Para estes casos, sugere-se que a maioria dos grupos funcionais do aldeído estão reticulados com a rede polimérica, não induzindo efeitos citotóxicos [43, 124].

As estruturas com a concentração de 1% de GA apenas mantêm a viabilidade das células, não havendo proliferação por parte das mesmas ao longo do tempo. No que diz

respeito às concentrações mais elevadas de GA (5% e 10%), verifica-se uma diminuição progressiva do número de células ao longo dos dias de cultura, indiciando um baixo desempenho biológico por parte destes *scaffolds*, possivelmente devido a um excesso de dialdeídos livres, o que sugere que quantidades menores de GA favorecem o desempenho biológico destes materiais.

Na Figura 33 apresentam-se as imagens obtidas por SEM das culturas celulares na presença dos diferentes biomateriais. Não foi possível incluir imagens do material controlo colonizado, uma vez que as suas propriedades mecânicas não permitiram a manutenção da sua integridade durante o tempo de cultura.

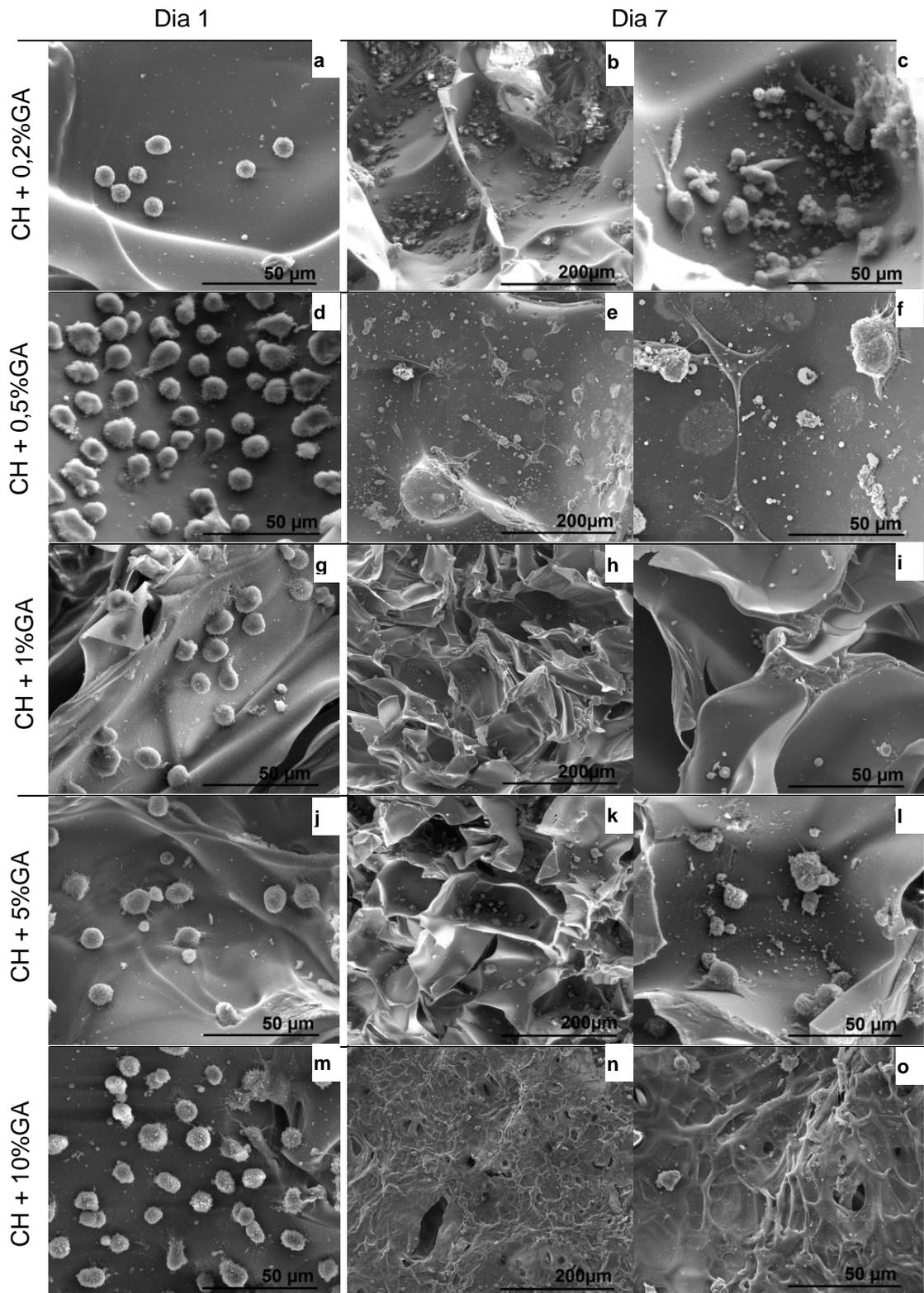


Figura 33 – Imagens de SEM das culturas celulares estabelecidas nos diferentes *scaffolds* em estudo.

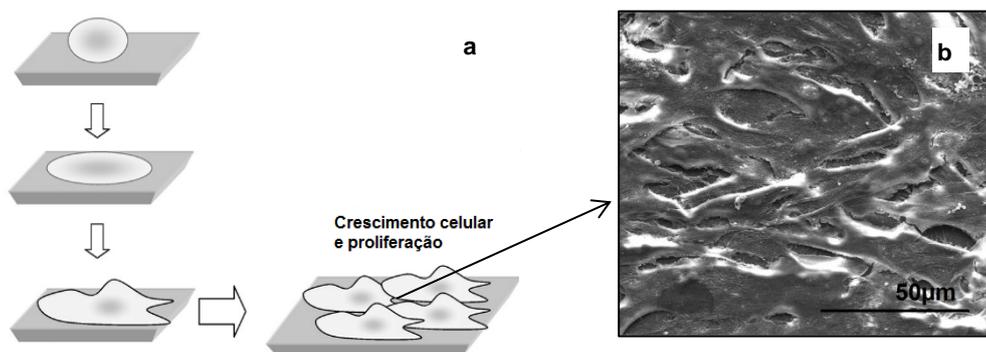
Na avaliação por SEM verificou-se a adesão de um número considerável de células em todos os *scaffolds* (1 dia de cultura), com morfologias bastante semelhantes

entre si, ou seja, com forma arredondada e com reduzidos prolongamentos citoplasmáticos.

Após uma semana de cultura, observa-se uma alteração no número e morfologia celulares, nos *scaffolds* avaliados. Nas estruturas com 0,2%, 0,5% e 1% de GA verifica-se a presença de um maior número de células. Os *scaffolds* de quitosano com 0,2% e 0,5% da GA apresentam as células com a morfologia mais alongada e exibem uma forma achatada e com numerosas prolongações citoplasmáticas, que são características do fenótipo desta população celular.

As estruturas com 5% e 10% de GA aos 7 dias de cultura apresentaram um número reduzido de células, não se detectando diferenças significativas na sua morfologia em relação ao primeiro dia, isto é, mantendo uma morfologia essencialmente esférica.

Segundo a literatura, o espalhamento das células é geralmente dividido em três principais níveis de interação: (a) não espalhadas: as células apresentam ainda uma forma esférica sem qualquer tipo de extensão da membrana plasmática, (b) parcialmente distribuídas: nesta fase, as células começam a espalhar-se lentamente por um ou mais lados, no entanto ainda há uma divergência nas extensões da membrana e (c) totalmente espalhadas. O último modelo (c) representa o melhor resultado a nível do desempenho biológico [124]. Na Figura 34 está representado um desenho esquemático da interação célula-substrato.



**Figura 34 - Ilustração do processo de interação célula/substrato: adesão, espalhamento e proliferação e imagem SEM que ilustra a morfologia típica das células MG-63. Adaptado de: [124].**

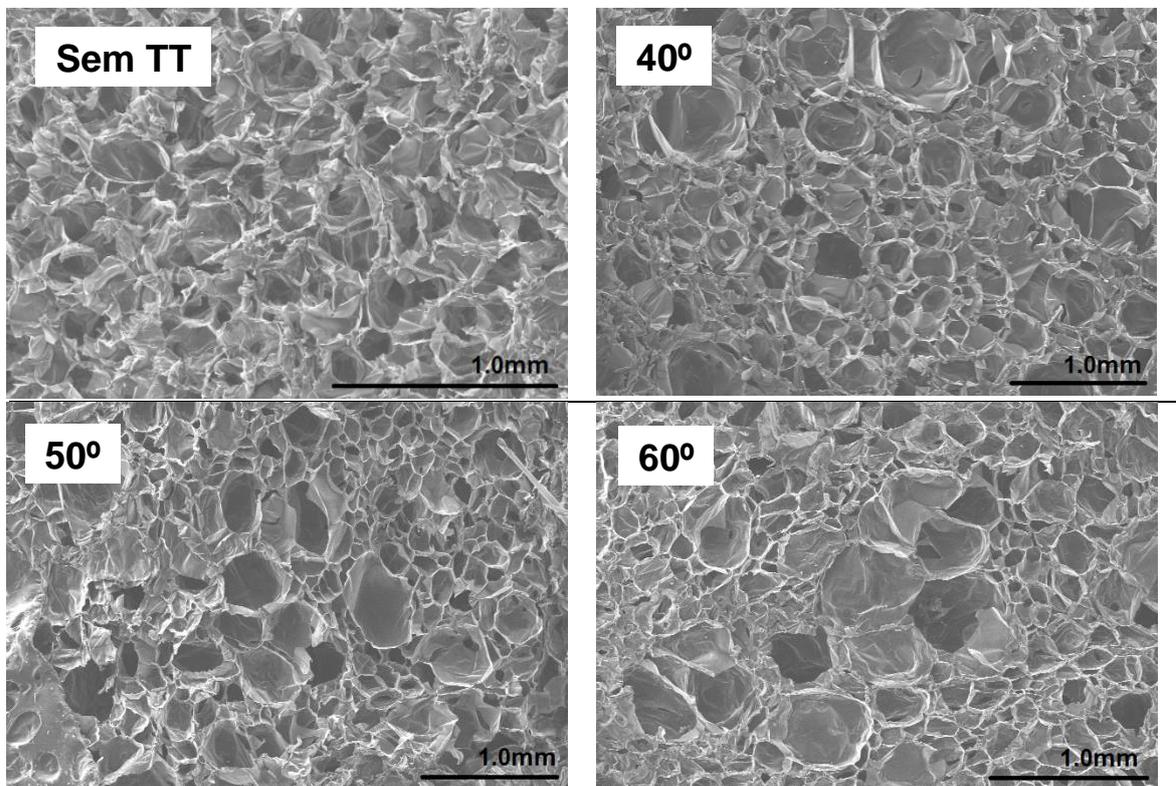
Face a todos estes resultados, conclui-se que os *scaffolds* com as concentrações de 0,2%, 0,5% e 1% de GA, apesar de não possuírem as melhores propriedades mecânicas, são os que apresentam o melhor comportamento celular, em termos de

proliferação e morfologia de célula. Comprova-se, assim, que uma concentração elevada desse agente reticulante influencia negativamente o desempenho biológico.

Numa tentativa de otimizar a resistência mecânica dos *scaffolds* em questão, aplicou-se um tratamento térmico durante o seu processo de fabrico por forma a avaliar se ocorrem efectivamente alterações na reticulação e, conseqüentemente, na estrutura final dos *scaffolds*.

Para tal, fabricaram-se *scaffolds* de quitosano com a concentração média de GA (0,5%) e posteriormente submetem-se estes *scaffolds* a um tratamento térmico a três temperaturas diferentes (40°, 50° e 60°C) durante 2 horas.

As diferenças microestruturais destes *scaffolds* estão evidenciadas nas micrografias obtidas por SEM apresentadas na Figura 35.



**Figura 35 - Micrografias obtidas por SEM dos scaffolds de quitosano com 0,5% de GA sem tratamento e submetidos a tratamento térmico de 40°, 50° e 60°, durante 2 horas.**

Verifica-se que todos os *scaffolds* apresentam poros bem definidos e interligados, não se detectando alteração significativa da sua forma com o aumento da temperatura.

Na figura seguinte comparam-se graficamente as curvas de distribuição de tamanho dos poro dos *scaffolds* sujeitos aos diferentes tratamentos térmicos.

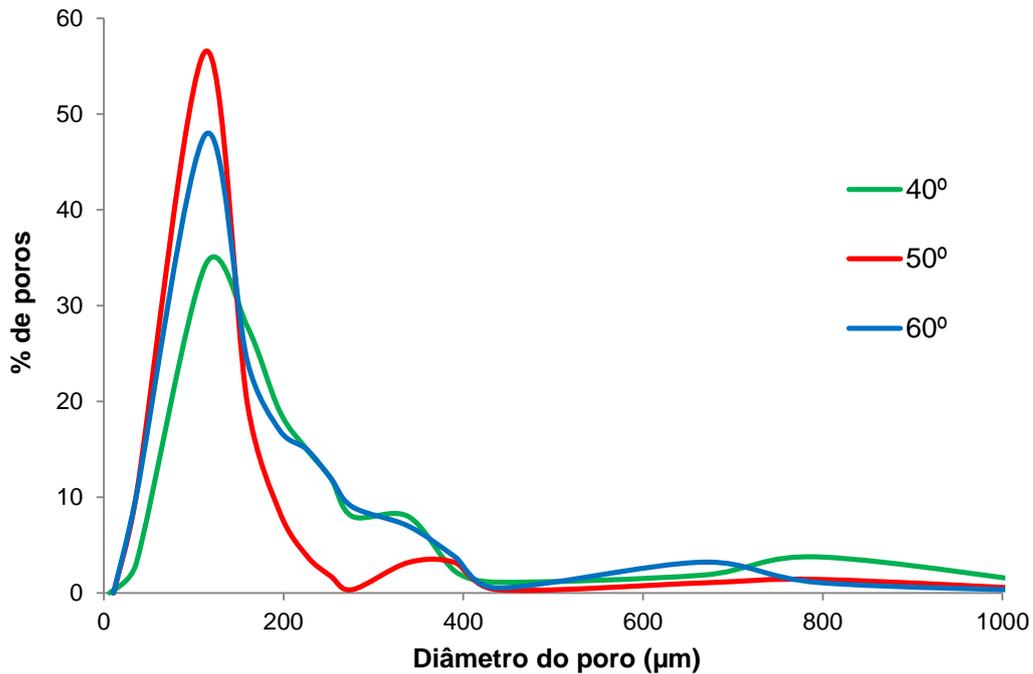
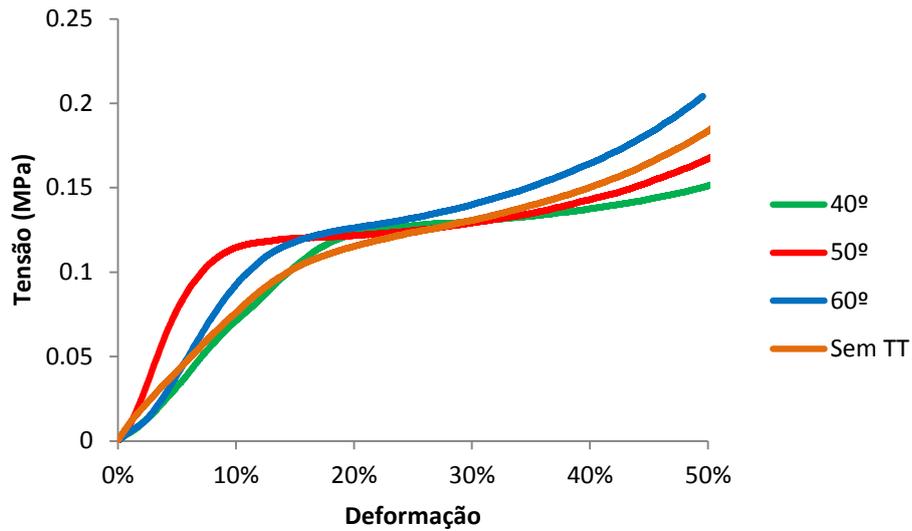


Figura 36 - Distribuição do tamanho de poros dos *scaffolds* de quitosano com 0,5% de GA após tratamento térmico de 40°C, 50°C e 60°C.

Pela análise da figura, é possível afirmar que os *scaffolds* com os diferentes tratamentos térmicos apresentam uma elevada concentração de poros com o tamanho correspondente a 110 µm. Com o tratamento térmico, a população de poros finos aumenta e tendencialmente verifica-se uma ligeira diminuição de tamanho de poro. A menor porosidade foi obtida para os *scaffolds* tratados termicamente a 50°C, seguida dos *scaffolds* com tratamento térmico a 60°C e 40°C, respectivamente.

Na Figura 37 estão representadas as curvas de tensão-deformação que ilustram o comportamento mecânico à compressão dos *scaffolds* tratados termicamente. Para efeitos comparativos incluiu-se na mesma figura a curva relativa ao *scaffold* não tratado termicamente.



**Figura 37 - Comportamento mecânico dos scaffolds de quitosano com 0,5% de GA submetidos a tratamento térmico de 40°, 50° e 60°.**

Pela análise dos resultados, observa-se genericamente uma melhoria do comportamento mecânico dos scaffolds com o tratamento térmico, o que sugere que o tratamento térmico influencia positivamente a reticulação do quitosano.

As alterações na estrutura do quitosano induzidas pelo calor também foram observadas por Lim *et al.* [125], os quais produziram filmes de quitosano reticulado com GA e observaram alterações nas características dos filmes, apresentando uma resistência melhorada atribuída a uma maior formação de ligações entre quitosano e glutaraldeído.

A partir das curvas tensão-deformação, calcularam-se os módulos de Young dos diferentes *scaffolds* (Tabela 8).

**Tabela 8 - Módulos de Young dos diferentes *scaffolds* tratados termicamente.**

<i>Scaffolds</i>	Módulo de Young (MPa)
CH+0,5%GA	0,76
CH+0,5%GA+ TT 40°C	0,79
CH+0,5%GA+ TT 50°C	1,66
CH+0,5%GA+ TT 60°C	0,95

A temperatura a que se obtiveram os maiores valores de módulo de Young foi a de 50°C. Estes resultados estão de acordo com curva de distribuição de tamanho de poro deste *scaffold* que, comparativamente com as dos restantes, reflecte uma distribuição de tamanhos mais estreita, com menor contribuição de poros largos, o que beneficia as propriedades mecânicas do *scaffold*.

Face a estes resultados a temperatura de tratamento térmico escolhida para aplicar aos *scaffolds* reforçados com os grânulos foi a de 50°C.

### 4.3 Caracterização das membranas compósitas

Para avaliar o comportamento de superfície dos *scaffolds* compósitos, prepararam-se membranas com composições idênticas à dos *scaffolds* (quitosano + reticulante + grânulos). No seguimento dos resultados obtidos nos ensaios citotóxicos, que evidenciaram que a resposta celular mais adequada foi obtida para os *scaffolds* com 0,2% e 0,5% de GA, escolheram-se as concentrações de 0,2% e de 0,5% de reticulante para a preparação das membranas. Estas foram caracterizadas quanto à sua rugosidade e molhabilidade.

Na Tabela 9 apresentam-se as diferentes composições das membranas preparadas bem como a sua identificação.

Tabela 9 – Composição das membranas e respectiva designação.

Membranas	CH	Grânulos			Glutaraldeído	
		HAp	Bifásicos	B-TCP	0,2%	0,5%
Quitosano (CH)	X					
CH + 0,2%GA	X				X	
CH + 0,5%GA	X					X
CH+ HAp	X	X				
CH+ B-TCP	X			X		
CH+ Bifásicos	X		X			
CH+ HAp + 0,2%GA	X	X			X	
CH+ HAp + 0,5%GA	X	X				X
CH+ Bifásicos + 0,2%GA	X		X		X	
CH+ Bifásicos + 0,5%GA	X		X			X

### 4.3.1 Rugosidade

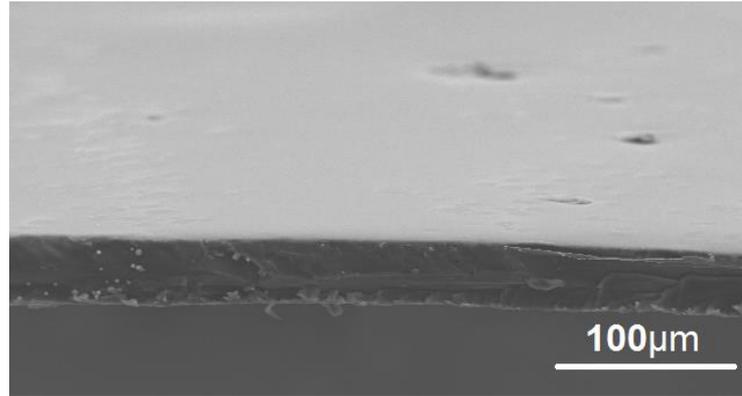
A rugosidade das superfícies é outro parâmetro que tem elevada influência na biocompatibilidade pois pode alterar a força de adesão das células à superfície e modificar a conexão entre as mesmas [126].

Através de um profilômetro foi possível medir a rugosidade média das membranas preparadas. Na Tabela 10 encontram-se registados os respectivos valores para as diferentes membranas.

**Tabela 10- Valores médios das medições das rugosidades, Ra, das diferentes membranas.**

Membrana	Ra ( $\mu\text{m}$ )
Quitosano	$1,5 \pm 0,6$
Quitosano+ 0,2%GA	$2,0 \pm 0,5$
Quitosano+ 0,5%GA	$2,9 \pm 0,6$
Quitosano + HAp	$>8,0$
Quitosano + Bifásicos	$>8,0$
Quitosano + $\beta$ -TCP	$>8,0$
Quitosano+ HAp+ 0,2%GA	$3,6 \pm 1,2$
Quitosano+HAp+0,5%GA	$4,5 \pm 1,3$
Quitosano+ Bifásicos+ 0,2%GA	$4,3 \pm 1,2$
Quitosano+ Bifásicos+ 0,5%GA	$5,1 \pm 2,1$

Através da tabela é possível constatar que todas as membranas produzidas apresentam valores de rugosidade na microescala. As membranas de quitosano são as que apresentam a rugosidade menor, atingindo uma rugosidade média de aproximadamente  $1,5 \mu\text{m}$ . Na Figura 38 é possível observar a morfologia da membrana de quitosano.



**Figura 38 - Micrografia obtida por SEM da membrana de quitosano.**

Através da imagem obtida por SEM da membrana de quitosano, é possível observar a superfície praticamente plana e uniforme, com aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  de espessura.

Com a incorporação do glutaraldeído na composição, verifica-se um aumento gradual da rugosidade, aumentando quase para o dobro no caso da membrana com 0,5% de GA. Quando se adiciona o GA, este inicia de imediato a reticulação estabelecendo ligações entre cadeias. A solução fica mais viscosa dificultando o seu espalhamento na lamela, obtendo-se assim membranas mais espessas e com uma superfície menos uniforme, o que pode explicar estes resultados. Na Figura 39 estão representadas as micrografias obtidas por SEM das membranas de quitosano com 0,2% e 0,5% de glutaraldeído.

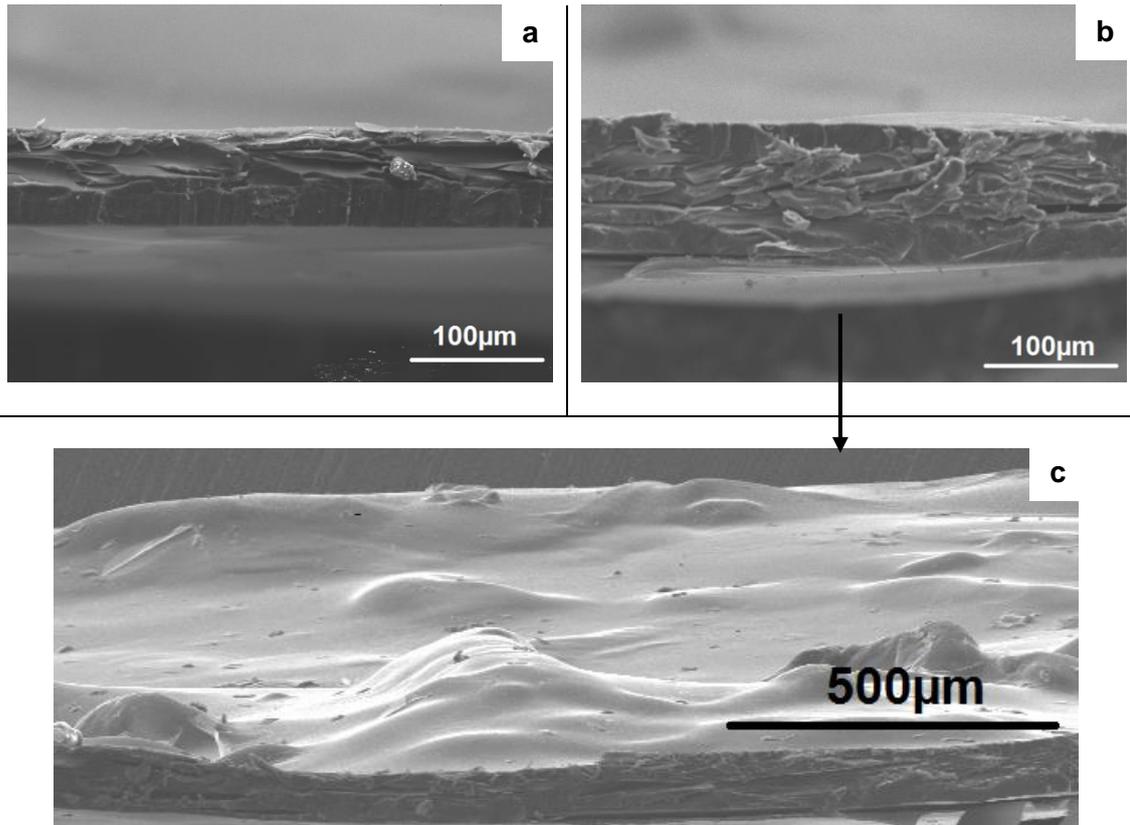


Figura 39 – Imagens de SEM da secção transversal das membranas de quitosano com (a) 0,2%GA e (b) 0,5%GA. A imagem (c) representa a superfície da membrana de CH+0,5%GA.

As membranas representadas apresentam uma estrutura densa, sendo possível observar que a espessura aumenta com o aumento da percentagem de GA, rondando os valores médios de 60  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$  de espessura para 0,2% e 0,5% de GA respectivamente.

Como se pode comprovar também através da Figura 39 (c), é notória a presença de pequenas irregularidades na superfície da membrana de CH com 0,5% de GA, aumentando para 2,9  $\mu\text{m}$  a rugosidade média da membrana.

Quando se incorporam grânulos nas membranas é de esperar que a rugosidade das suas superfícies aumente, uma vez que estes ficam dispersos por toda a membrana (ver Figura 40). Não foi possível medir a rugosidade das membranas de quitosano que continham apenas os grânulos uma vez que estas excediam o limite máximo de rugosidade admitido. No entanto, foi possível observar a sua morfologia através das imagens obtidas por SEM, apresentadas na Figura 40.

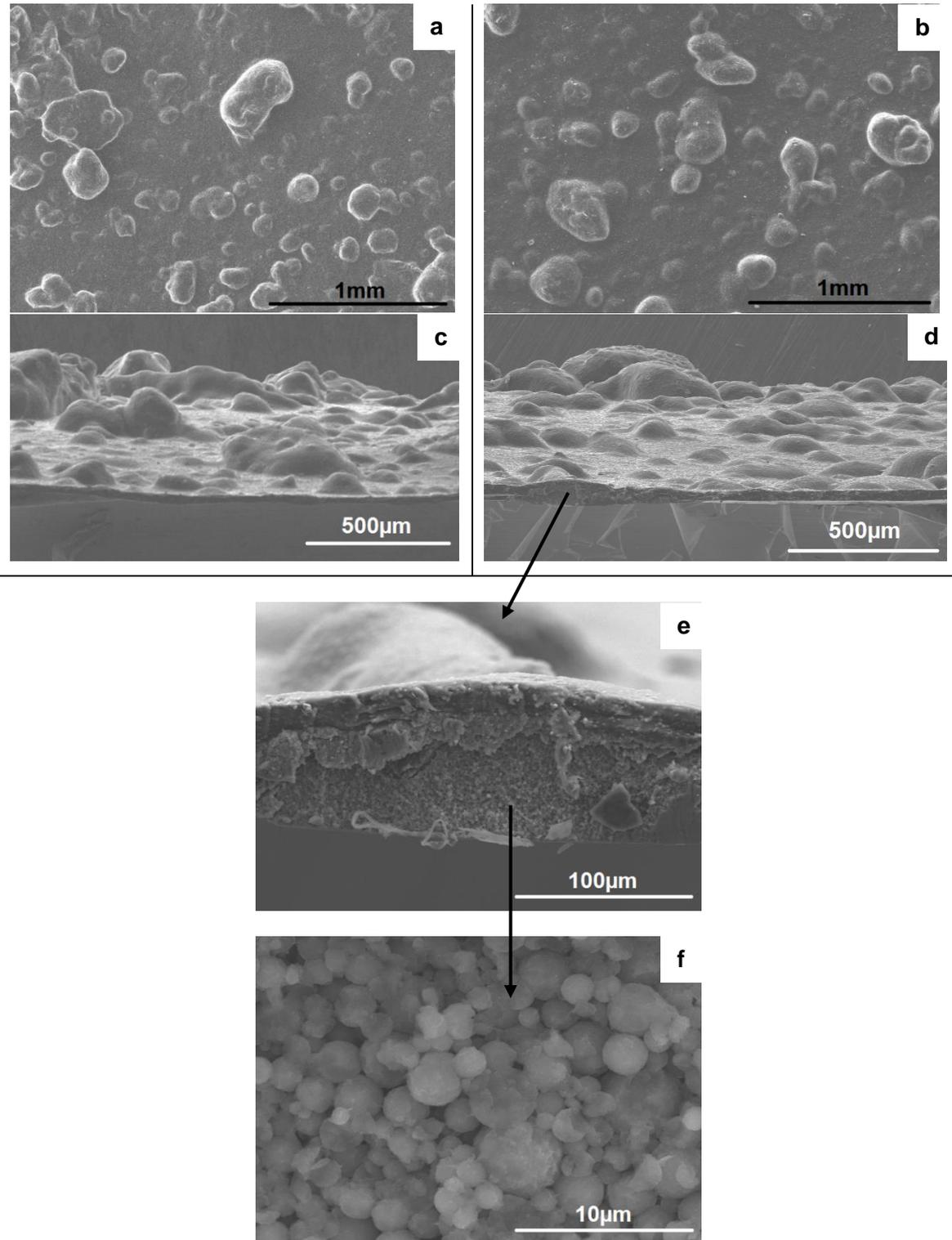


Figura 40 - Imagens SEM da superfície e da secção transversal das membranas de quitosano com grânulos bifásicos (a) e (c) e de HAp (b) e (d). As imagens (e) e (f) correspondem a um pormenor de um aglomerado da membrana de HAp.

Através da Figura 40 (a), (b), (c) e (d) é possível observar o perfil rugoso das membranas com grânulos de HAp e Bifásicos, verificando-se que esta última apresenta

uma maior rugosidade à superfície, com imensos agregados irregulares, maiores do que os da membrana com HAp. Na Figura 40 (e) e (f) é possível observar pormenorizadamente a morfologia e a constituição desses aglomerados.

Os grânulos bifásicos, como já caracterizados anteriormente, apresentam um tamanho menor e uma superfície mais irregular comparativamente com os grânulos de HAp. O seu reduzido tamanho faz com que estes apresentem uma maior energia de superfície, tornando-os mais propícios à agregação; por isso, quando aplicados nestas membranas induzem maiores valores de rugosidade.

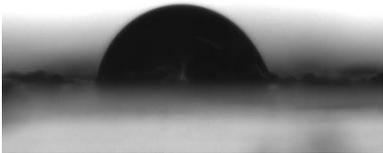
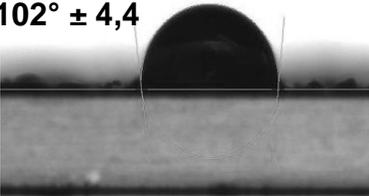
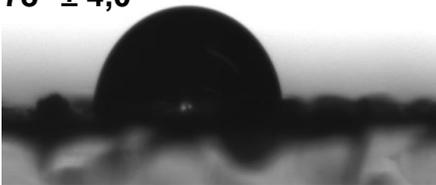
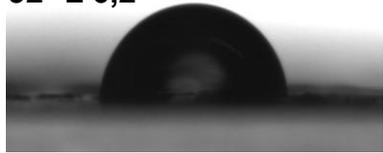
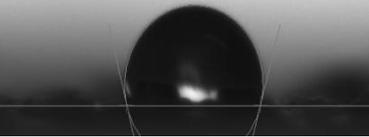
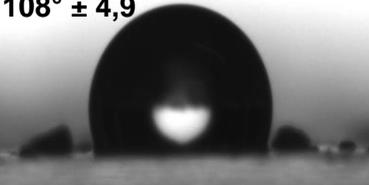
Quando se introduz GA e grânulos em simultâneo nas membranas, os valores da sua rugosidade diminuem, pelo que já são possíveis as medições com o profilómetro. Essa diminuição da rugosidade pode atribuir-se, possivelmente, à reticulação do quitosano que, envolvendo a matriz em redor dos grânulos, contribui para a formação de uma estrutura mais densa e menos susceptível a irregularidades na superfície.

#### **4.3.2 Molhabilidade**

Fabricaram-se membranas de quitosano reticulado, de quitosano com grânulos e de quitosano com a adição conjunta de grânulos e GA. Pretendeu-se avaliar a influência do reticulante (para tal utilizaram-se concentrações de 0,2% e de 0,5% de glutaraldeído) na molhabilidade bem como a dos grânulos de HAp, dos grânulos bifásicos e do  $\beta$ -TCP. Esta última membrana apenas foi preparada para validar a possível influência do  $\beta$ -TCP na composição dos grânulos bifásicos.

Avaliou-se também o comportamento das membranas de quitosano com a adição conjunta de grânulos (HAp e Bifásicos) e glutaraldeído (0,2% e 0,5%). Os resultados obtidos das medições dos ângulos de contacto das diferentes membranas apresentam-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Ângulo de contacto médio medido das diferentes membranas.

Quitosano + Agente Reticulante (GA)		Quitosano + Grânulos de CaP		Quitosano + GA + Grânulos de CaP	
Membrana	Ângulo de contacto médio	Membrana	Ângulo de contacto médio	Membrana	Ângulo de contacto médio
Quitosano	<b>79° ± 1,6</b> 	Quitosano + HAp	<b>102° ± 4,4</b> 	Quitosano + HAp + 0,2%GA	<b>78° ± 4,0</b> 
Quitosano + 0,2%GA	<b>92° ± 6,2</b> 	Quitosano + Bifásicos	<b>107° ± 4,5</b> 	Quitosano + HAp + 0,5%GA	<b>93° ± 3,3</b> 
Quitosano + 0,5%GA	<b>105° ± 3,1</b> 	Quitosano + β-TCP	<b>108° ± 4,9</b> 	Quitosano + Bifásicos + 0,2%GA	<b>89° ± 6,6</b> 
				Quitosano + Bifásicos + 0,5%GA	<b>95° ± 5,0</b> 

Observa-se que as membranas de quitosano possuem valores de ângulos de contacto inferiores a 90°, sendo por isso consideradas hidrofílicas. Do ponto de vista da reactividade química, o quitosano apresenta propriedades hidrofílicas devido à presença de grupos reactivos amino e hidroxilo na sua estrutura [42].

A literatura relata uma série valores de ângulos de contacto para membranas de quitosano puro que vão de 60° a 83°. Estes valores dependem da pureza do material precursor e da rugosidade final da membrana [127]. No trabalho de Wanichapichart *et al.* [128] membranas de quitosano puro com rugosidades à nanoescala apresentaram um ângulo de contacto em torno de 65°. Este valor é inferior ao obtido no presente estudo (79°), o que pode dever-se às diferenças do grau de acetilação do quitosano utilizado, bem como aos valores superiores de rugosidade (à escala micrométrica) das membranas produzidas neste trabalho.

O comportamento das membranas de quitosano com reticulante adicionado pode ser considerado hidrofóbico uma vez que possuem valores de ângulos de contacto superiores a 90°, com um aumento de 12° e 25° para adições de 0,2% e 0,5% de GA em comparação com membrana de quitosano. Por conseguinte, a adição do agente de reticulação além de alterar a estrutura dos *scaffolds*, como já anteriormente referido, altera também a molhabilidade, observando-se uma diminuição da hidrofilicidade da superfície com o aumento da percentagem de GA.

Este comportamento está de acordo com resultados obtidos por outros autores, segundo os quais o glutaraldeído diminui a capacidade do quitosano formar ligações de hidrogénio com moléculas de água uma vez que os grupos amina do quitosano ficam imobilizados com a acção da reticulação, tornando as membranas mais hidrofóbicas [43, 129]. É assim possível afirmar que à medida que se aumenta a concentração de GA, as superfícies tornam-se progressivamente mais hidrofóbicas, sugerindo que para concentrações superiores a 0,5% os valores dos ângulos de contacto sejam superiores a 105°.

A partir da Tabela 11 é também possível constatar que a introdução de grânulos na matriz de quitosano induz uma alteração significativa na molhabilidade da membrana, ocasionando a diminuição da sua hidrofilicidade. Quando se incorporam grânulos bifásicos nas membranas de quitosano verifica-se um ligeiro aumento da hidrofobicidade da superfície quando comparadas com as membranas de HAp. Esses resultados foram validados com a medição dos ângulos de contacto em membranas com grânulos de  $\beta$ -TCP, verificando-se um aumento do valor médio do ângulo de contacto para 108°. Conclui-se deste modo que a membrana de HAp, apesar de apresentar um ângulo de

contacto médio superior a 90°, é a que apresenta valores de hidrofobicidade mais baixos, se comparada com as membranas com grânulos bifásicos e com  $\beta$ -TCP.

Observando a Tabela 11 novamente, observa-se que a incorporação conjunta de grânulos e de glutaraldeído é menos penalizante para o ângulo de contacto do que a adição isolada de cada um dos componentes (GA ou grânulos).

A adição de um componente *estranho* (o grânulo) à membrana de CH com glutaraldeído perturba a reticulação uma vez que o grupo  $-NH_2$  do quitosano e o grupo  $-COOH$  do GA deixarão de interacionar regularmente devido à presença dos grânulos dispersos na matriz que dificultam a ligação desses mesmos grupos. Com uma menor reticulação é de esperar que as superfícies da membrana apresentem propriedades mais hidrofílicas (comparativamente às membranas reticuladas) devido a uma maior presença de grupos  $-NH_2$  livres à superfície. Por outro lado deve referir-se que estas membranas apresentam uma rugosidade média inferior à das membranas com grânulos, não reticuladas. Daub *et al.* [130] fizeram estudos de molhabilidade em superfícies quimicamente equivalentes mas com diferentes rugosidades e observaram que, para superfícies mais hidrofóbicas, o aumento da rugosidade se traduziu num aumento do ângulo de contacto, ou seja, no aumento da hidrofobicidade da superfície. Os presentes resultados estão em linha com este comportamento pois a diminuição da rugosidade das membranas com grânulos induzida pela reticulação fez-se acompanhar de uma diminuição da hidrofobicidade das mesmas.

A Figura 41 ilustra as curvas de tendência (ou seja, a curva média obtida a partir das sete medições efectuadas para cada membrana) da variação do comportamento hidrofóbico/hidrofílico da membrana de quitosano e das membranas com a composição semelhante aos scaffolds compósitos. A avaliação ao longo do tempo é fundamental quando, por exemplo, se pretende caracterizar biomateriais uma vez que estes, quando implantados, serão envolvidos permanentemente por fluídos corporais, o que é o caso. É importante que estes assumam um comportamento hidrofílico, uma vez que, como reportado anteriormente, as proteínas e as células tendem a ligar-se a superfícies hidrofílicas.

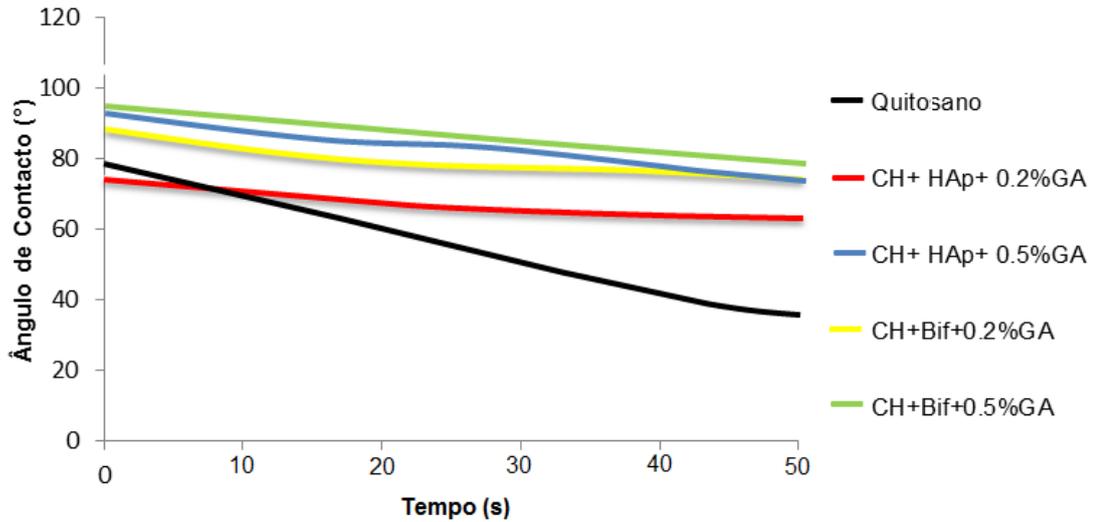


Figura 41 - Curvas tendência das medições do ângulo de contacto ao longo do tempo para as diferentes membranas.

Através deste gráfico é possível concluir que as membranas tendem a adquirir um comportamento hidrofílico ao longo do tempo, verificando-se uma diminuição progressiva do ângulo de contacto. Segundo a literatura, esta diminuição do ângulo deve-se à acomodação da gota na superfície das membranas [131].

Estes resultados indicam que a gota de água interage com as membranas através dos grupos hidroxilo e amino do quitosano, espalhando-se gradualmente pela superfície. Quanto mais grupos livres existirem na superfície da membrana, mais interações ocorrerão entre a água e esses grupos [132]. Com a adição conjunta do agente reticulante e dos grânulos, existirão menos grupos disponíveis à superfície, o que se traduz numa menor interação água-superfície comparativamente com a situação da membrana de quitosano puro.

#### 4.4 Caracterização dos scaffolds compósitos

Na Tabela 12 apresentam-se as condições de preparação e composição dos vários tipos de *scaffolds* compósitos e a respectiva designação.

Tabela 12 - Descrição dos scaffolds e dos materiais utilizados no respectivo fabrico.

Scaffolds	CH	Grânulos		GA			Tratamento térmico
		HAp	Bifásicos	0,2%	0,5%	1%	
HAp + 0,2% GA	X	X		X			
HAp + 0,5% GA	X	X			X		
HAp + 1% GA	X	X				X	
HAp + Tratamento térmico	X	X			X		X
Bifásicos + 0,2% GA	X		X	X			
Bifásicos + 0,5% GA	X		X		X		
Bifásicos + 1% GA	X		X			X	
Bifásicos + Tratamento térmico	X		X		X		X

Na Figura 42 apresentam-se as microestruturas dos diferentes tipos de *scaffolds* de HAp.

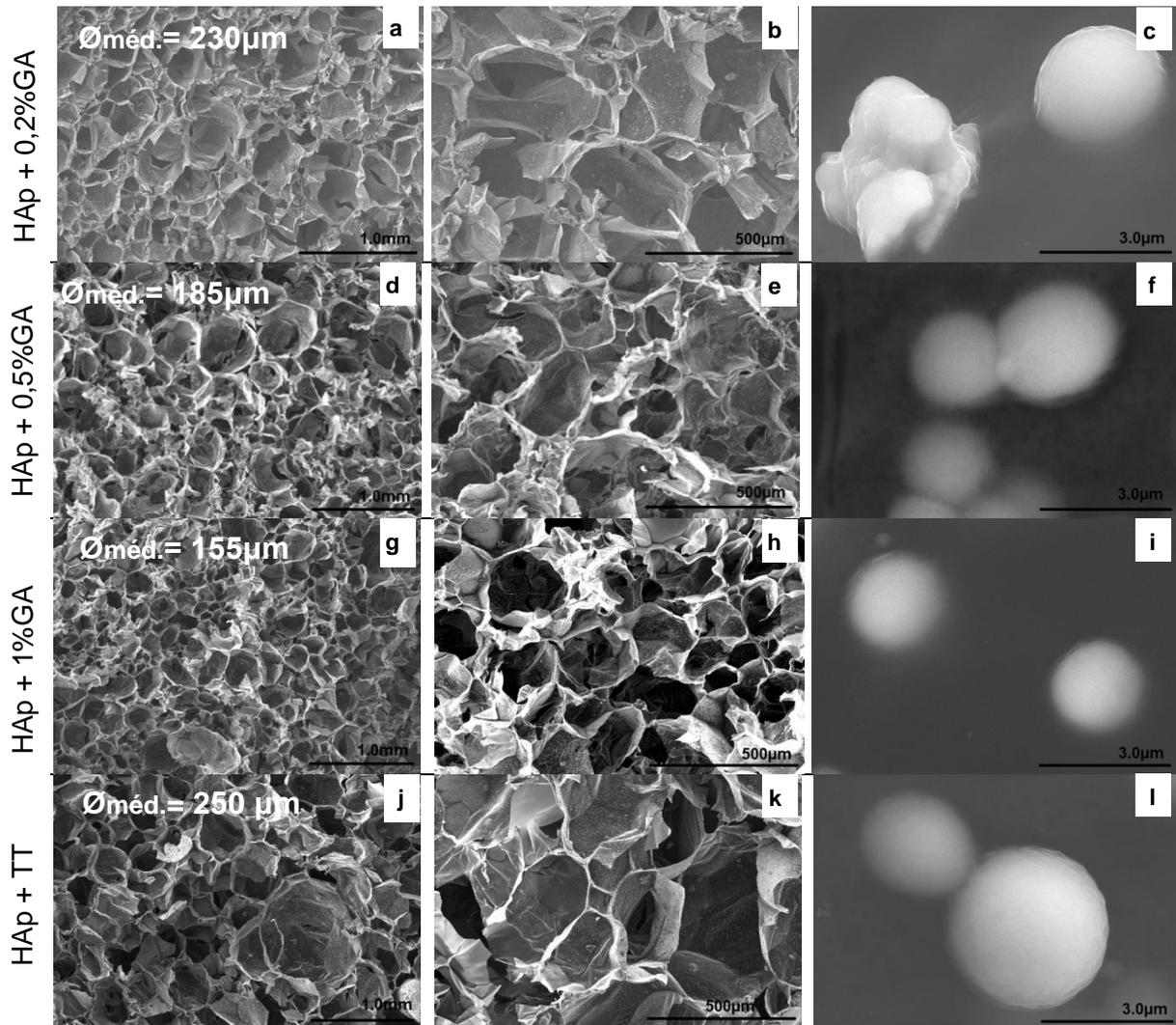


Figura 42 - Micrografias obtidas por SEM dos *scaffolds* de HAp com: a), b), c) 0,2% de GA, d), e), f) 0,5% de GA, g) h), i) 1% de GA e j), k), l) com tratamento térmico, com os respectivos valores do tamanho médio de poro.

Da análise das figuras pode verificar-se a presença de uma estrutura com poros bem organizados e definidos, observando-se uma boa conexão entre eles, o que pode constituir um factor com influência positiva na taxa de deposição óssea. É ainda possível constatar que os grânulos se encontram distribuídos de uma forma uniforme nas paredes dos poros, verificando-se um aumento da espessura das paredes. Pode observar-se, também, que os grânulos mantêm a sua morfologia quando inseridos nos *scaffolds* como se pode verificar na Figura 42 c), f) i) e l).

No que se refere ao tamanho de poros, verifica-se uma ligeira redução de tamanho à medida que se aumenta a concentração de glutaraldeído. Com o tratamento térmico, há um ligeiro aumento do tamanho de poro em relação aos *scaffolds* sem tratamento.

O comportamento mecânico dos *scaffolds* compósitos com grânulos de HAp nos ensaios de compressão está ilustrado na Figura 43 através das respectivas curvas de tensão-deformação.

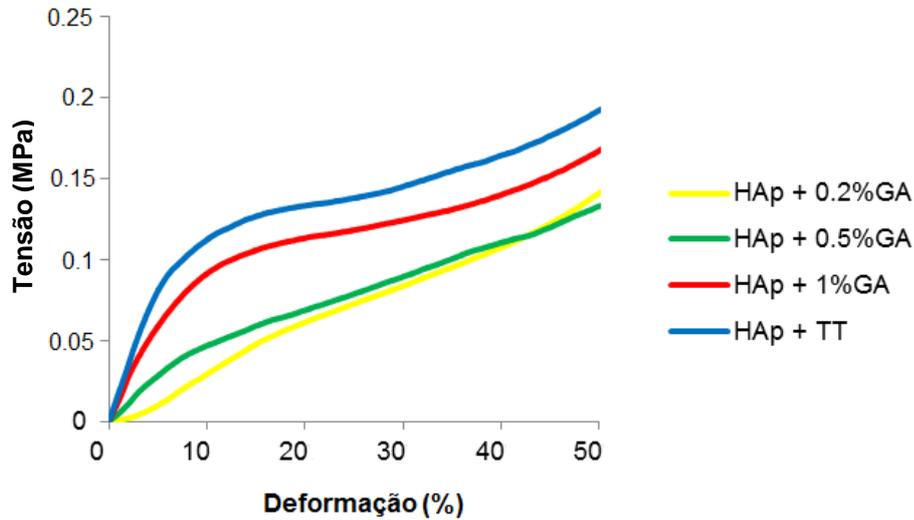


Figura 43 - Comportamento mecânico dos diferentes scaffolds de HAp.

Como se verificou anteriormente e como se comprova com estes resultados, à medida que se aumenta a percentagem de glutaraldeído, verifica-se uma melhoria das propriedades mecânicas dos *scaffolds* devido à sua acção reticulante sobre o quitosano; da mesma forma o tratamento térmico também ajuda na reticulação, verificando-se também melhorias significativas comparativamente com mesmo *scaffold* sem o tratamento (HAp+0,5%GA).

Na Tabela 13 estão apresentados os valores dos módulos de Young calculados a partir das curvas de tensão-deformação para os diferentes *scaffolds* de HAp.

Tabela 13 - Módulos de Young dos diferentes *scaffolds* de HAp.

<i>Scaffolds</i>	Módulo de Young (MPa)
HAp+0,2%GA	0,35
HAp+0,5%GA	0,53
HAp+1%GA	1,28
HAp+ TT (0,5%GA)	1,72

Os valores obtidos revelam o aumento do módulo de Young com o aumento do teor de reticulante. Os *scaffolds* de HAp com 0,2% e 0,5% de GA apresentam valores inferiores às matrizes reticuladas com as mesmas concentrações de GA (Tabela 7). Estes resultados devem-se à dificuldade do quitosano em reticular na presença dos grânulos, o que diminui consideravelmente as propriedades mecânicas das estruturas. O déficit de reticulação apenas é compensado com o aumento de concentração de GA ou com a aplicação do tratamento térmico aos *scaffolds*. Para estes casos, os *scaffolds* com grânulos incorporados apresentam módulos de Young superiores comparativamente aos mesmos sem os grânulos (Tabela 7). Os grânulos distribuem-se pelas paredes dos poros do scaffold, tornando-as mais espessas, tornando a estrutura mais resistente.

Na Figura 44 apresentam-se as micrografias obtidas por SEM dos diferentes *scaffolds* com grânulos bifásicos.

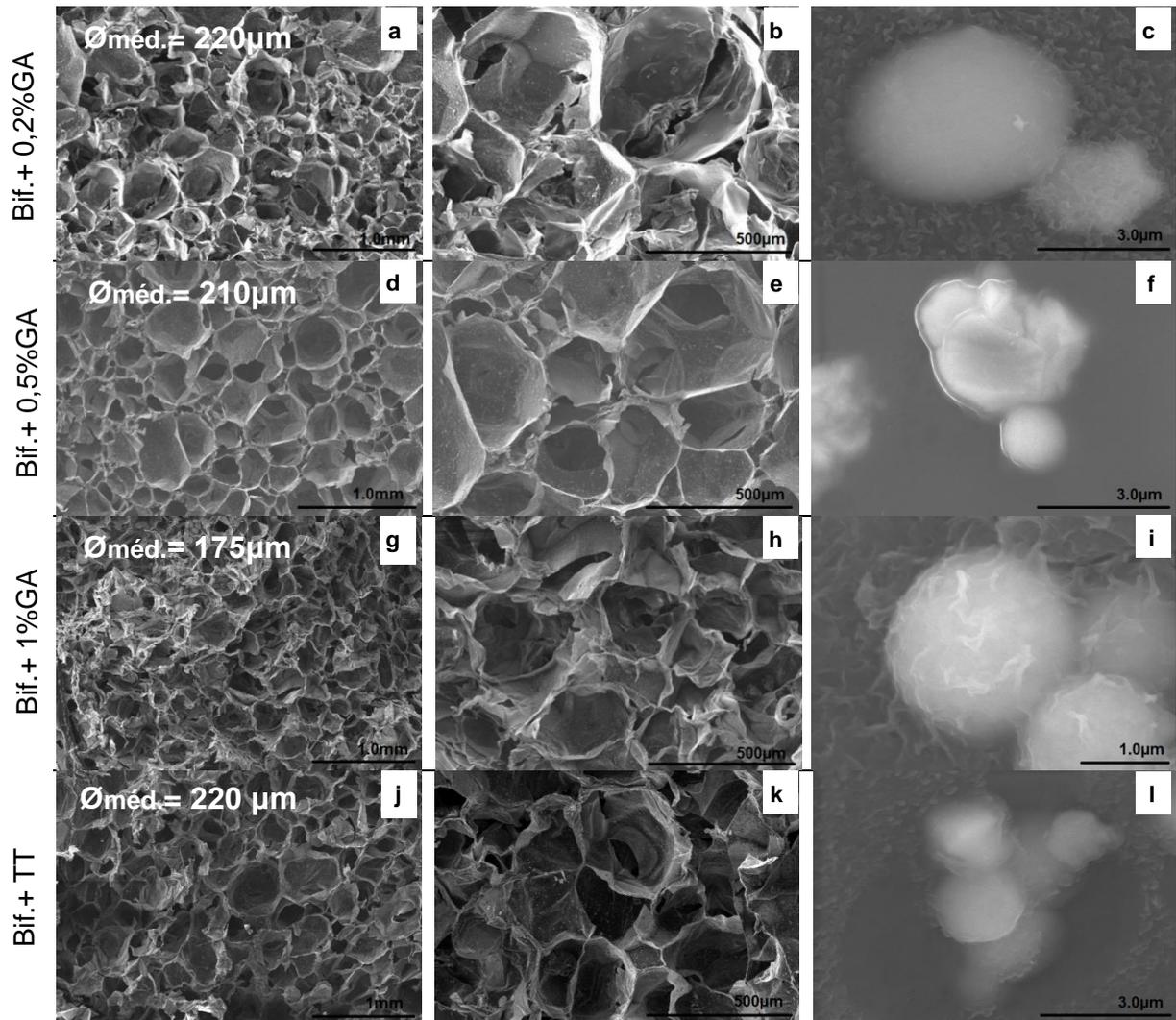


Figura 44 - Micrografias obtidas por SEM dos *scaffolds* bifásicos com: a), b), c) 0,2% de GA, d), e), f) 0,5% de GA, g) h), i) 1% de GA e j), k), l) com tratamento térmico, com os respectivos valores médios para o tamanho de poro.

Os *scaffolds* com grânulos bifásicos de HAp e  $\beta$ -TCP [50:50] incorporados apresentam uma microestrutura idêntica ao nível da estrutura de poro quando comparados com os mesmos com grânulos de HAp. A morfologia dos grânulos bifásicos também não se altera após todos os processos de fabrico dos presentes *scaffolds*.

O tamanho de poros deste tipo de *scaffolds* exibe uma gama idêntica à dos *scaffolds* de HAp, com um tamanho médio a rondar também os 200  $\mu$ m. Os valores obtidos de ambos os tipos de *scaffolds* apresentam o tamanho considerado apropriado para promover o bom desempenho das células osteoblásticas, que está referenciado na gama dos 100-350  $\mu$ m [81].

Quando se aplica o tratamento térmico a estes *scaffolds*, verifica-se um tamanho médio de poros inferior ao dos de HAp sujeitos ao mesmo tratamento, passando de 250  $\mu\text{m}$  para 215  $\mu\text{m}$ .

Na figura seguinte estão representadas as curvas de tensão-deformação dos *scaffolds* bifásicos referentes aos ensaios de compressão a que foram sujeitos.

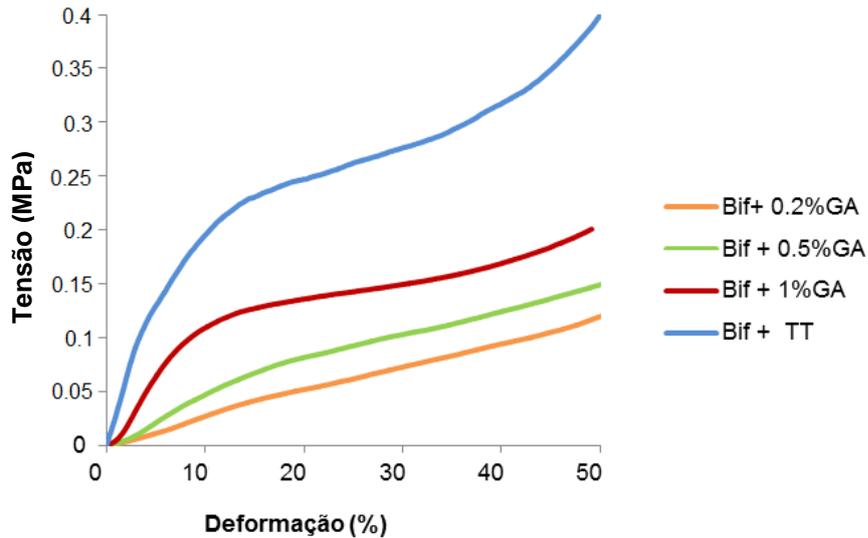


Figura 45 - Comportamento mecânico dos diferentes *scaffolds* bifásicos.

Pela análise das curvas da Figura 45 pode confirmar-se que as propriedades mecânicas são melhoradas com o aumento progressivo da concentração de glutaraldeído na composição dos *scaffolds*, bem como com a aplicação do tratamento térmico.

Na Tabela 14 estão apresentados os valores dos módulos de Young calculados a partir das curvas de tensão-deformação para os diferentes *scaffolds* com HAp.

Tabela 14 - Módulos de Young dos diferentes *scaffolds* com grânulos bifásicos.

<i>Scaffolds</i>	Módulo de Young (MPa)
Bif.+0,2% GA	0,32
Bif.+0,5% GA	0,52
Bif.+1% GA	1,42
Bif.+ TT	3,43

Verifica-se que a introdução de  $\beta$ -TCP nos grânulos faz melhorar significativamente o comportamento mecânico das estruturas com glutaraldeído acima dos 0,5% (comparativamente aos *scaffolds* de HAp), em que, por exemplo, se regista um aumento do módulo de Young de 1,28 MPa (*scaffolds* de HAp com 1% GA) para 1,42 MPa (*scaffolds* bifásicos com 1% GA).

Para baixas concentrações de GA, verifica-se a mesma situação dos *scaffolds* com HAp, em que se verifica um módulo de Young inferior comparativamente às matrizes de CH reticuladas com as mesmas concentrações (0,2 e 0,5% de GA).

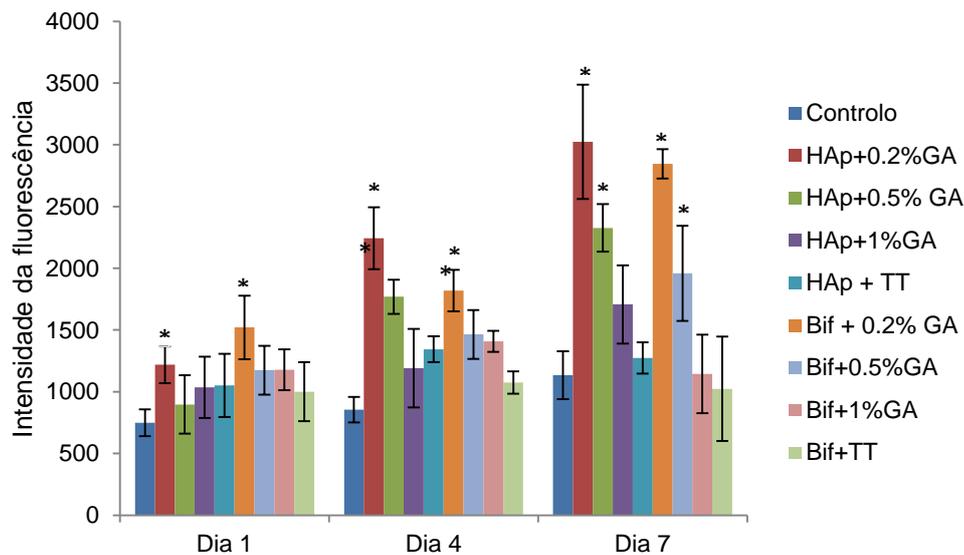
O tratamento térmico aplicado a este tipo de *scaffolds* torna a estrutura mais resistente comparativamente a todos os outros produzidos, exibindo um módulo de Young de 3,43 MPa.

Em conclusão, as propriedades mecânicas dos *scaffolds* compósitos (quitosano reticulado + grânulos) obtidas no presente trabalho apresentaram-se inferiores às referidas para o osso esponjoso apresentadas na Tabela 1, nomeadamente entre 2 a 12 MPa para a resistência à compressão e 0,1 a 2 GPA para o módulo de Young. No entanto, os valores medidos são semelhantes aos reportados na literatura, particularmente para *scaffolds* preparados por métodos idênticos aos utilizados neste trabalho. Por exemplo, Zhang *et al.* [41] produziram *scaffolds* de CH reforçados com  $\beta$ -TCP com uma razão mássica de CH/  $\beta$ -TCP de [50/50] e obtiveram valores de resistência à compressão de 2,191 MPa. Este valor encontra-se situado na gama de valores das resistência à compressão obtidas pelos *scaffolds* com grânulos bifásicos de HAp e  $\beta$ -TCP [50:50].

### 4.3. Citocompatibilidade dos *scaffolds* compósitos

Feitas todas as caracterizações a nível da morfologia e propriedades mecânicas aos *scaffolds* compósitos com os grânulos, avaliou-se então o seu desempenho biológico quando cultivados com células osteoblásticas.

Realizou-se, inicialmente, o teste da resazurina para avaliar a viabilidade e proliferação celular, tendo sido utilizado como controlo *scaffolds* de quitosano com 0,5% de GA. A Figura 46 apresenta os resultados obtidos aos dias 1, 4 e 7.

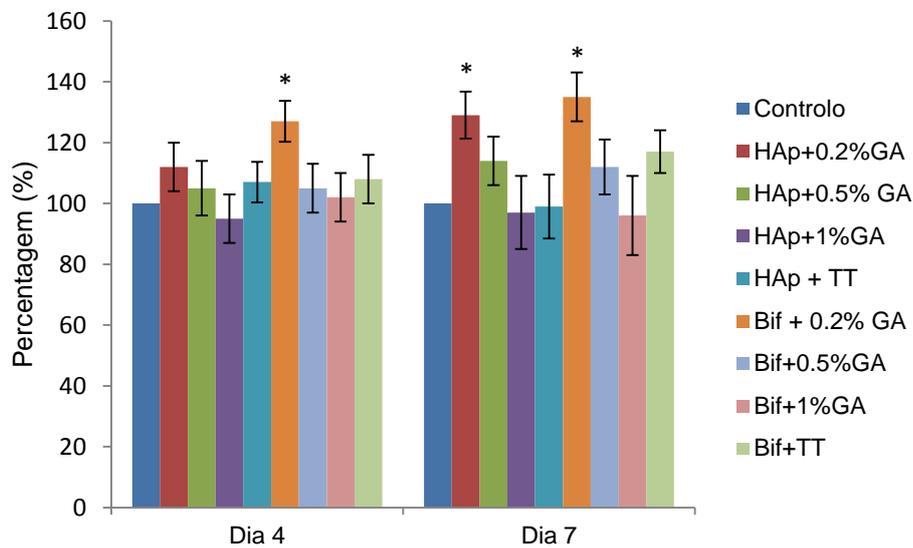


**Figura 46 - Comportamento dos diferentes *scaffolds* de HAp e bifásicos face à presença de células através do ensaio de viabilidade celular - resazurina. \* Diferença estatisticamente significativa comparativamente ao controlo ( $p < 0.05$ ).**

Ao analisar a figura, verifica-se que o comportamento biológico é melhorado com a adição dos grânulos de CaP. Ao primeiro dia da experiência verifica-se um aumento significativo da actividade metabólica das culturas estabelecidas nos *scaffolds* de HAp + 0,2%GA e Bif + 0,2%GA, comparativamente com o controlo e com os restantes *scaffolds*. Ao 4º dia, verifica-se que as células mantêm a sua viabilidade em todos os materiais, dando-se um aumento significativo da viabilidade/proliferação celular nos *scaffolds* de HAp e Bifásicos com as menores concentrações de GA, ou seja 0,2% e 0,5%. Ao 7º dia verifica-se um aumento da redução da resazurina, destacando-se, pelo aumento significativo, os *scaffolds* com 0,2% de GA, quer para HAp quer para os bifásicos.

Outro ensaio realizado neste estudo de biocompatibilidade foi a determinação da actividade da fosfatase alcalina (ALP). Tratando-se estes *scaffolds* de potenciais

estruturas para aplicação em engenharia de tecido ósseo, é interessante determinar a actividade da ALP, uma vez que se trata de uma enzima presente em elevada concentração no tecido ósseo, essencialmente secretada pelos osteoblastos, exibindo funções essenciais na formação do osso. Posto isto, avaliou-se a actividade da ALP das culturas em que estão presentes os diferentes *scaffolds* aos dias 4 e 7. Os resultados obtidos estão representados graficamente na Figura 47, apresentando-se estes em percentagem relativamente ao controlo (*scaffolds* de quitosano com 0,5% de GA), ou seja, quer para o dia 4 quer para o dia 7, o controlo corresponde a 100% e as restantes condições são variações relativamente a esse valor.

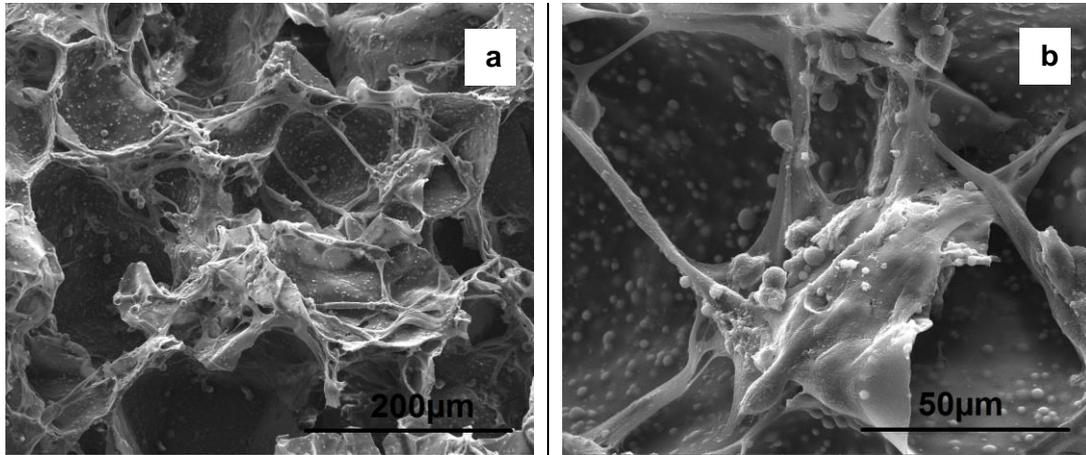


**Figura 47 - Actividade da fosfatase alcalina das culturas estabelecidas nos diferentes *scaffolds* de HAp e bifásicos. Todos os resultados estão apresentados em percentagem relativamente o controlo, correspondendo este a 100% quer para o dia 4 quer para o dia 7. \* Diferença estatisticamente significativa comparativamente ao controlo ( $p < 0.05$ ).**

Através desta caracterização é possível verificar que a actividade da ALP aumenta de forma significativa na condição de Bif+ 0,2%GA, ao dia 4 e dia 7, verificando-se também um aumento da expressão desta enzima ao dia 7 para os *scaffolds* de HAp + 0,2% de GA.

Estes resultados sugerem que os *scaffolds* com menor concentração de GA (0,2%) parecem induzir um aumento da expressão fenotípica desta população osteoblástica, particularmente os *scaffolds* Bif+0,2%GA, em que se verifica um aumento significativo da expressão da enzima ao dia 4 e 7 de cultura.

Na Figura 48 é possível observar o comportamento (morfologia e adesão) celular das culturas estabelecidas nos *scaffolds* de HAp com 0,2%GA ao final dos 7 dias de experiência.



**Figura 48 - Imagens SEM da cultura celular presente nos *scaffolds* de HAp com 0,2%GA ao final de 1 dia de experiência.**

As células exibem uma boa adesão ao *scaffold* ao final de 7 dias, verificando-se a existência de agregados celulares (sinal de proliferação activa no material), apresentando a sua morfologia de acordo com as características do fenótipo desta população celular, ou seja, com a sua forma bem achatada e com elevado número de prolongamentos citoplasmáticos.

Na Figura 49, apresentam-se micrografias obtidas por SEM das culturas celulares estabelecidas nos *scaffolds* bifásicos com 0,2% de GA, ao dia 1 e 7 de cultura.

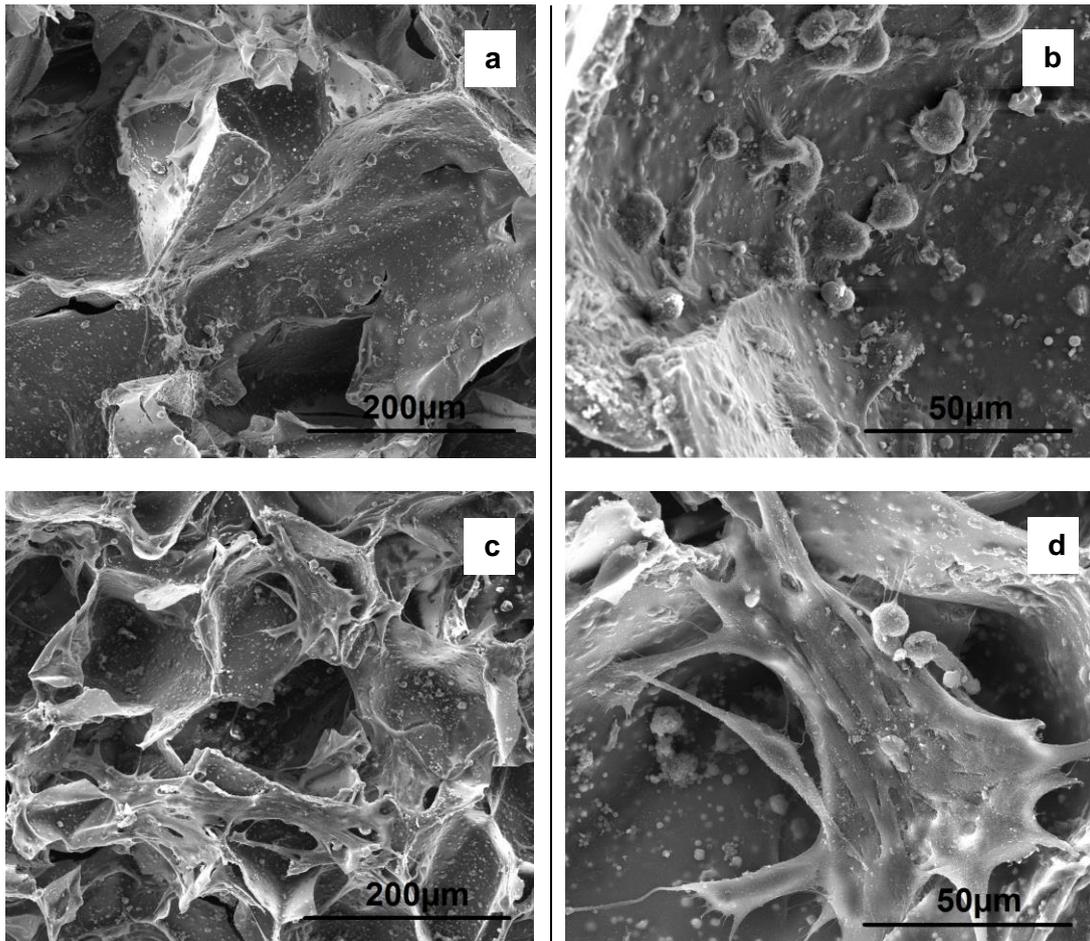


Figura 49 - Imagens SEM da cultura celular presente nos scaffolds bifásicos com 0,2%GA ao final de 1 dia (a, b) e 7 dias (c, d) de experiência.

Como se pode verificar, encontra-se um número elevado de células aderidas à superfície do *scaffold* ao final do primeiro dia, apresentando estas uma forma arredondada com pequenos alongamentos do citoplasma. Por sua vez, aos 7 dias, a morfologia das células é alterada, verificando-se um alongamento das células pela superfície, demonstrando uma boa adesão por parte destas ao material.

A Tabela 15 apresenta um quadro resumo das características dos *scaffolds* compósitos avaliados biologicamente, designadamente das suas características de superfície, microestruturais e de comportamento mecânico.

Tabela 15 - Quadro resumo de todos os resultados obtidos na caracterização dos *scaffolds* e das membranas compósitas(as).

Scaffolds/ Membranas Compósitas(as)		HAp				Bifásicos			
		0,2% GA	0,5% GA	1% GA	0,5% GA + TT	0,2% GA	0,5% GA	1% GA	0,5% GA + TT
Scaffolds	Tamanho médio dos poros ( $\mu\text{m}$ )	184	155	227	252	218	175	209	217
	Módulo de Young (MPa)	0,35	0,53	1,28	1,72	0,32	0,52	1,42	3,43
	Resistência à compressão	0,14	0,16	0,17	0,22	0,13	0,15	0,2	0,41
Membranas	Molhabilidade – Ângulos de Contacto	78°	93°	-	-	89°	95°	-	-
	Rugosidade ( $\mu\text{m}$ )	3,6	4,5	-	-	4,3	5,1	-	-

Os resultados obtidos permitem assim concluir que:

- Os *scaffolds* com grânulos de HAp ou grânulos bifásicos, com a percentagem de 0,2% de reticulante, destacam-se entre os demais no que se refere ao desempenho biológico, ao passo que o pior desempenho foi registado para os *scaffolds* com 1% de glutaraldeído. Estes factos indiciam que a característica mais impactante na resposta celular é, no caso dos presentes *scaffolds*, a concentração de reticulante: quanto menor, melhor é a resposta celular.
- Embora as membranas compósitas com grânulos bifásicos tivessem evidenciado uma hidrofobicidade superior à das membranas com hidroxiapatite, tal diferença não se verifica de forma significativa no comportamento biológico dos *scaffolds* correspondentes.
- Apesar das propriedades mecânicas melhoradas que foram evidenciadas pelos *scaffolds* sujeitos a tratamento térmico, a resposta biológica destes não foi a mais interessante. Tal facto deve reflectir a relativamente elevada concentração de reticulante (0,5%).

# Capítulo 5

---

## Conclusões e Futuros Desenvolvimentos



## 5. Conclusões e Futuros Desenvolvimentos

Com o presente trabalho foi possível obter *scaffolds* compósitos de quitosano e grânulos de fosfato de cálcio para aplicações na regeneração óssea, com o principal objectivo de estudar o impacto de diversas características desses *scaffolds* na resposta celular. Avaliou-se o impacto da porosidade, hidrofiliicidade, rugosidade e propriedades mecânicas em culturas celulares da linhagem MG-63 a nível da sua viabilidade, proliferação, adesão, morfologia e nível da actividade da fosfatase alcalina.

O estudo contemplou as seguintes etapas: (1) produção e caracterização de grânulos de HAp e de misturas bifásicas por atomização de suspensões; (2) produção de *scaffolds* compósitos de quitosano com variações na sua reticulação e grânulos de CaP por congelamento e liofilização, com respectiva caracterização morfológica (SEM) e comportamento mecânico; (3) preparação de membranas com as mesmas composições dos *scaffolds* por forma a avaliar parâmetros da sua superfície, designadamente molhabilidade (ângulos de contacto) e rugosidade; (4) avaliação da resposta celular aos *scaffolds* produzidos, nomeadamente a viabilidade e proliferação celular através do método da resazurina, a adesão e morfologia celular através da observação de micrografias obtidas por SEM e a actividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP/Proteína).

Na etapa de produção e caracterização de grânulos de CaP, obtiveram-se grânulos atomizados com tamanho micrométrico, tendo-se evidenciado uma ligeira aglomeração das partículas iniciais com perda de área superficial específica. Os grânulos apresentam forma esférica no caso da HAp e uma forma mais irregular com a incorporação do  $\beta$ -TCP na composição do grânulo (grânulos bifásicos). A cristalinidade dos CaP não foi alterada com o processo de atomização.

O estudo da resposta celular às matrizes de quitosano reticuladas com diferentes teores de GA evidenciou que as concentrações mais baixas de GA (0,2%, 0,5% e 1%) são as que apresentam um melhor desempenho biológico, diminuindo este com o aumento progressivo de reticulante.

Verificou-se, também, que a aplicação de um tratamento térmico durante o processo de fabrico dos *scaffolds* resulta num desempenho mecânico melhorado o que indicia uma optimização da reticulação sob tratamento térmico.

As medições da rugosidade indicam irregularidades micrométricas na superfície das membranas compósitas, na gama dos 1,5 a 5,1  $\mu\text{m}$ , irregularidades estas que aumentam notoriamente com a introdução dos grânulos.

As medidas dos ângulos de contacto das membranas revelaram superfícies mais ou menos hidrofóbicas dependendo da composição da membrana. Verificou-se uma diminuição da hidrofilicidade das membranas de quitosano com o aumento da percentagem de reticulante. Membranas de CH e grânulos na constituição evidenciaram ser superfícies hidrofóbicas, possivelmente reflectindo a influência de outras propriedades de superfície como é o caso da rugosidade. A incorporação de  $\beta$ -TCP indicou uma maior hidrofobicidade da superfície. A reticulação das matrizes compósitas traduziu-se numa diminuição da hidrofobicidade e da rugosidade quando comparadas com as membranas equivalentes não reticuladas.

No que se refere ao desempenho biológico dos scaffolds compósitos, observou-se que independentemente da composição dos seus grânulos (HAp ou grânulos bifásicos), os *scaffolds* com 0,2% de reticulante, são os que se destacam em termos de desempenho biológico ao passo que os scaffolds com 1% de glutaraldeído apresentam o pior desempenho. Estes factos indiciam que a característica mais impactante na resposta celular é a concentração de reticulante. Embora as membranas compósitas com grânulos bifásicos tivessem evidenciado uma hidrofobicidade superior à das membranas com hidroxiapatite, tal diferença não se reflectiu de forma significativa no comportamento biológico dos *scaffolds* correspondentes. Apesar das propriedades mecânicas melhoradas que foram evidenciadas pelos *scaffolds* sujeitos a tratamento térmico, a resposta biológica destes scaffolds não foi a mais interessante. Tal facto reflecte a relativamente elevada concentração de reticulante (0,5%).

Pode assim concluir-se que as células têm preferência por matrizes reticuladas com baixa concentração de reticulante.

Pode pois afirmar-se que os *scaffolds* produzidos no presente trabalho, quer os de HAp quer os bifásicos com baixas concentrações de GA, demonstraram evidências de propriedades e de desempenho biológico que os apontam como as estruturas mais promissoras para aplicação em ET ósseo.

### Trabalho futuro

Os resultados obtidos no presente trabalho remeteram a algumas sugestões para a continuação deste trabalho, bem como ao aprofundamento de certos aspectos no sentido de clarificar certos resultados. Deste modo sugere-se:

- Avaliar pormenorizadamente todos os parâmetros que influenciam a reticulação, otimizando esta de forma a que concentrações baixas de GA reticulem o máximo de quitosano.
- Aplicar um tratamento aos scaffolds de remoção do glutaraldeído que não foi utilizado na reticulação por forma a aumentar o desempenho biológico.
- Estudar as propriedades mecânicas dos scaffolds com estes submersos num líquido simulador corporal, uma vez que se observam diferenças significativas nas propriedades mecânicas ao mergulhar os scaffolds num fluido.
- Prosseguir com mais caracterizações a nível biológico, como por exemplo avaliar a expressão de genes característicos do fenótipo osteoblástico através de metodologias de rt-PCR.
- Investigar a possibilidade de incorporar outro tipo de biomaterial na composição, capaz de elevar as propriedades a nível mecânico sem alterar consideravelmente a arquitectura e superfície dos scaffolds.
- Testar os scaffolds *in vivo* em animais de experimentação.

## Referências

1. Salgado, A.J., O.P. Coutinho, and R.L. Reis, *Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends*. Macromolecular Bioscience, 2004. **4**(8): p. 743-765.
2. Chan BP, L.K., *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*. European Spine Journal, 2008. **17**(4): p. 467-479.
3. Eberli, D., *Tissue Engineering*. InTech. 2010
4. Barroca, N.B., *Scaffolds à base de polímeros piezoelétricos para regeneração óssea*, Tese de mestrado no Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro 2008, Universidade de Aveiro: Aveiro.
5. Olivier, V., N. Faucheux, and P. Hardouin, *Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery*. Drug Discovery Today, 2004. **9**(18): p. 803-811.
6. Vadgama, P., *Surfaces and interfaces for biomaterials*. Vol. 2. 2005: Woodhead Publishing Limited.
7. Bandyopadhyay, S.B.M.R.A., *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. Trends in Biotechnology, 2012. **30**(10).
8. Chu, P.K. and X. Liu, *Biomaterials Fabrication and Processing Handbook* 2008: CRC Press.
9. Eberli, D., *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials* 2011. 588.
10. Gomes, M.E., et al., *Influence of the Porosity of Starch-Based Fiber Mesh Scaffolds on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells Cultured in a Flow Perfusion Bioreactor* Tissue Engineering, 2006. **12**(4): p. 801-809.
11. Lewandrowsky, K.U., et al., *Tissue Engineering and Biodegradable Equivalents: Scientific and Clinical Applications*, 2002: Marcel Dekker, Inc.
12. Vitrali, J.C.d.A., et al., *Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica*. Pesq Bras Odontoped Clin Integr, 2008. **8**(3): p. 359-365.
13. Radu, A., et al., *In vitro biocompatibility testing of implantable biomaterials*. Roumanian Biotechnological Letters, 2008. **13**(4): p. 3863-3872.

14. Martins, A.M.d.S.B., *Métodos in vitro para o screening de biomateriais*, tese de mestrado na *Escola Superior de Saúde de Aveiro* 2006, Universidade de Aveiro: Aveiro.
15. Mesquita, C.M.D., *Matrizes de quitosano/grânulos bifásicos para libertação de fármacos*, tese de mestrado no *Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica* 2012, Universidade de Aveiro: Aveiro.
16. Watkins, B.A., et al., *Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function*. *Progress in Lipid Research*, 2001. **40**(1–2): p. 125-148.
17. Barrère, F., C.A.v. Blitterswijk, and K.d. Groot, *Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics*. *Int J Nanomedicine*, 2006. **1**(3): p. 317–332.
18. Mistry, A.S. and A.G. Mikos, *Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration*. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2005. **94**: p. 1-22.
19. Completo, A. and F. Fonseca, *Fundamentos de Biomecânica - Músculo, Esquelética e Ortopédica* 2011: PUBLINDUSTRIA. 444.
20. Seeley, R.D., T.D. Stephens, and P. Tate, *Anatomia & fisiologia* 1993: Sorbona.
21. Cowin, S.C., *Bone Mechanics Handbook*. 2 ed 2001: CRC Press. 980.
22. Liu, Y., J. Lim, and S.H. Teoh, *Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering*. *Biotechnology Advances*.
23. Wagoner Johnson, A.J. and B.A. Herschler, *A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair*. *Acta Biomaterialia*, 2011. **7**(1): p. 16-30.
24. Marques, A.C.F., *Grânulos porosos para regeneração óssea e libertação controlada de fármacos*, Tese de mestrado no *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro* 2010, Universidade de Aveiro: Aveiro.
25. Isikli, C., V. Hasirci, and N. Hasirci, *Development of porous chitosan–gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds for hard tissue-engineering applications*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2012. **6**(2): p. 135-143.
26. Rucci, N., *Molecular biology of bone remodelling*. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2008. **5**(1): p. 49-56.
27. Raggatt, L.J. and N.C. Partridge, *Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(33): p. 25103-25108.
28. Hadjidakis, D.J. and I.I. Androulakis, *Bone Remodeling*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006. **1092**(1): p. 385-396.

29. Rouhi, G., *Biomechanics of Osteoporosis: The Importance of Bone Resorption and Remodeling Processes*, in *Immunology, Allergology and Rheumatology - "Osteoporosis"*, Y. Dionyssiotis, Editor 2012.
30. Dimitriou, R., et al., *Bone regeneration: current concepts and future directions*. BMC Medicine, 2011. **9**(1): p. 66.
31. Gomes, M.M.E., *A Bone tissue engineering strategy based on starch scaffolds and bone marrow cells cultured in a flow perfusion bioreactor*, in *Departamento de Engenharia de Polímeros 2004*, Universidade do Minho: Braga.
32. BD Ratner, et al., *Biomaterials Science: Introduction to Materials in Medicine, 2nd Edition* 2004: Elsevier Academic Press
33. B. Subia, J.K.a.S.C.K., *Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications*. Tissue Engineering, 2010: p. 142-158.
34. Mistry, A.S. and A.G. Mikos, *Regenerative Medicine II: Clinical and Preclinical Applications*. Advances in Biochemical Engineering. Vol. 94. 2005: Springer Berlin Heidelberg.
35. Bose, S., M. Roy, and A. Bandyopadhyay, *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. Trends in Biotechnology, 2012. **30**(10): p. 546-554.
36. Jones, J.R., *New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure*. Journal of the European Ceramic Society, 2009. **29**(7): p. 1275-1281.
37. Vats, A., et al., *Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications*. Clinical Otolaryngology & Allied Sciences, 2003. **28**(3): p. 165-172.
38. Rose, F.R.A.J. and R.O.C. Oreffo, *Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **292**(1): p. 1-7.
39. MD, M.S., et al., *Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering*. European Journal of Trauma, 2006. **32**(2): p. 114-124.
40. Ito, M., et al., *Effect of hydroxyapatite content on physical properties and connective tissue reactions to a chitosan-hydroxyapatite composite membrane*. Journal of Biomedical Materials Research, 1999. **45**(3): p. 204-208.
41. Zhang, Y. and M. Zhang, *Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research, 2001. **55**(3): p. 304-312.
42. Shenvi, S.S., et al., *Preparation and characterization of PPEES/chitosan composite nanofiltration membrane*. Desalination, 2013. **315**(0): p. 135-141.

43. Berger, J., et al., *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **57**(1): p. 19-34.
44. Sailakshmi G., T.M., Suvro Chatterjee, A. Gnanamani, *Chemistry behind the Elastic Nature of the Biomaterial Prepared Using Oxidized Form of Glutaraldehyde and Chitosan - An Approach at 2D and 3D Level*. International Journal of Life Science and Medical Research, 2013. **4**(2): p. 64-75.
45. Akkuş Çetinus, Ş. and H. Nursevin Öztop, *Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **32**(7): p. 889-894.
46. Li, Y., et al., *Glutaraldehyde-crosslinked chitosan/hydroxyapatite bone repair scaffold and its application as drug carrier for icariin*. Journal of Applied Polymer Science, 2013. **130**(3): p. 1539-1547.
47. Piskin, E., *Biologically Modified Polymeric Biomaterial Surfaces*1992: Elsevier Applied Science.
48. Nair, L.S. and C.T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in Polymer Science, 2007. **32**(8–9): p. 762-798.
49. *Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review*. International Journal of Polymer Science, 2011. **2011**.
50. Ng, K.W., et al., *Bone biology*. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, 1997. **11**(1): p. 1-22.
51. von der Mark, K. and J. Park, *Engineering biocompatible implant surfaces: Part II: Cellular recognition of biomaterial surfaces: Lessons from cell–matrix interactions*. Progress in Materials Science, (0).
52. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 2941-2953.
53. Robert, A. and J. Latour, *Biomaterials: Protein–Surface Interactions*. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, 2005.
54. Nath, N., et al., *Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions*. Surface Science, 2004. **570**(1–2): p. 98-110.
55. Bhushan, B. and J. Utter, *Nanoscale adhesion, friction and wear of proteins on polystyrene*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **102**(0): p. 484-491.
56. Claesson, P.M., et al., *Protein interactions at solid surfaces*. Advances in Colloid and Interface Science, 1995. **57**(0): p. 161-227.

57. Dee, K.C., D.A. Puleo, and R. Bizios, *An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions* 2002, New Jersey: Wiley-Liss.
58. Kim, M.S., G. Khang, and H.B. Lee, *Gradient polymer surfaces for biomedical applications*. Progress in Polymer Science, 2008. **33**(1): p. 138-164.
59. Roach, P., et al., *Surface strategies for control of neuronal cell adhesion: A review*. Surface Science Reports, 2010. **65**(6): p. 145-173.
60. Liu, C., et al., *Air plasma processing of poly(methyl methacrylate) micro-beads: Surface characterisations*. Applied Surface Science, 2012. **259**(0): p. 840-846.
61. Ma, Z., Z. Mao, and C. Gao, *Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007. **60**(2): p. 137-157.
62. Yuan, Y. and T.R. Lee, *Contact Angle and Wetting Properties*, in *Surface Science Techniques* 3013, Springer Berlin Heidelberg. p. 3-34.
63. Menzies, K.L. and L. Jones, *The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials*. Optometry & Vision Science, 2010. **87**(6): p. 387-399  
10.1097/OPX.0b013e3181da863e.
64. Andrew J. Steward, Yongxing Liu, and D.R. Wagner, *Engineering cell attachments to scaffolds in cartilage tissue engineering*. Biomaterials for regenerative medicine, 2011. **63**(4): p. 74-82.
65. Bonakdara, S., et al., *Comparison of the Effect of Hydrophilicity on Biocompatibility and Platelet Adhesion of Two Different Kinds of Biomaterials*. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **4**(1): p. 37-44.
66. Bacakova, L., et al., *Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants*. Biotechnology Advances, 2011. **29**(6): p. 739-767.
67. Faucheux, N., et al., *Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies*. Biomaterials, 2004. **25**(14): p. 2721-2730.
68. Lee, J.H., et al., *Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient*. Journal of Colloid and Interface Science, 1998. **205**(2): p. 323-330.
69. Sanders, J.E., et al., *Fibro-porous meshes made from polyurethane micro-fibers: effects of surface charge on tissue response*. Biomaterials, 2005. **26**(7): p. 813-818.

70. Meyer, U., U. Joos, and H.P. Wiesmann, *Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering: Part I*. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2004. **33**(4): p. 325-332.
71. Thevenot, P., W. Hu, and L. Tang, *Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2008. **8**(4): p. 270-280.
72. Wang, Y.X., et al., *Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(8): p. 1362-1373.
73. Keselowsky, B.G., D.M. Collard, and A.J. García, *Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. **66A**(2): p. 247-259.
74. Schneider, G.B., et al., *The effect of hydrogel charge density on cell attachment*. Biomaterials, 2004. **25**(15): p. 3023-3028.
75. Engler, A.J., et al., *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification*. Cell, 2006. **126**(4): p. 677-689.
76. Yeung, T., et al., *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2005. **60**(1): p. 24-34.
77. Khademhosseini, A., et al., *Micro and Nanoengineering of the Cell Microenvironment: Technologies and Applications*, ed. edition2008: Artech House.
78. Murphy, C.M., et al., *Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad*. European cells & materials, 2013. **26**: p. 120-132.
79. McCullen, S.D., C.M. Haslauer, and E.G. Loba, *Musculoskeletal mechanobiology: Interpretation by external force and engineered substratum*. Journal of Biomechanics, 2010. **43**(1): p. 119-127.
80. Dado, D. and S. Levenberg, *Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009. **20**(6): p. 656-664.
81. Leong, K.F., et al., *Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2008. **1**(2): p. 140-152.
82. Hatano, K., et al., *Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene*. Bone, 1999. **25**(4): p. 439-445.

83. Lim, J.Y., et al., *Human foetal osteoblastic cell response to polymer-demixed nanotopographic interfaces*. Journal of the Royal Society Interface, 2005. **2**(2): p. 97-108.
84. Lei, B., et al., *Surface nanoscale patterning of bioactive glass to support cellular growth and differentiation*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. **94A**(4): p. 1091-1099.
85. Vagaská, B., et al., *Osteogenic Cells on Bio-Inspired Materials for Bone Tissue Engineering*. PHYSIOLOGICAL RESEARCH, 2010. **59**: p. 309-322.
86. Zhao, C., et al., *Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering*. Biotechnology Advances, (0).
87. Chung, T.W., et al., *Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale*. Biomaterials, 2003. **24**(25): p. 4655-4661.
88. Mehdizadeh, H., et al., *Three-dimensional modeling of angiogenesis in porous biomaterial scaffolds*. Biomaterials, 2013. **34**(12): p. 2875-2887.
89. Hulbert, S.F., et al., *Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses*. Journal of Biomedical Materials Research, 1970. **4**(3): p. 433-456.
90. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-5491.
91. Woodard, J.R., et al., *The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity*. Biomaterials, 2007. **28**(1): p. 45-54.
92. Holy, C.E., M.S. Shoichet, and J.E. Davies, *Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture period*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. **51**(3): p. 376-382.
93. Elshahawy, W., *Biocompatibility*, in *Advances in Ceramics - Electric and Magnetic Ceramics*, InTech, Editor 2011.
94. Kirkpatrick, C.J., et al., *In vitro methodologies to evaluate biocompatibility: status quo and perspective*. ITBM-RBM, 2005. **26**(3): p. 192-199.
95. Kirkpatrick, C.J., et al., *Current trends in biocompatibility testing*. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 1998. **212**(2): p. 75-84.
96. Fry, V.A.H., *Microglial glutathione and glutamate: Regulation mechanisms*, in *Institute of Neurology* 2009, ULC.

97. Downs, T.R. and W.W. Wilfinger, *Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue*. Analytical Biochemistry, 1983. **131**(2): p. 538-547.
98. Al-Nasiry, S., et al., *The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells*. Human Reproduction, 2007. **22**(5): p. 1304-1309.
99. GenycellBiotech. *Cell Quanti-Blue Cell Viability Assay Kits*. 08-12-2013]; Available from:  
[http://www.genycell.es/prod/biologia\\_celular/ensayos\\_de\\_reporteros.php?page=1&=#](http://www.genycell.es/prod/biologia_celular/ensayos_de_reporteros.php?page=1&=#).
100. Machado, A.P.d.S., *Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água*, Tese de mestrado no Departamento de Engenharia Biológica 2006, Universidade do Minho: Braga.
101. J, v.M., K. GJ, and C. J, *Cell sensitivity assays: the MTT assay*. Methods Mol Biol, 2011. **45**: p. 731-237.
102. Supino, R., *MTT Assays*. Methods in Molecular Biology, 1995. **43**: p. 137-149
103. *Enhanced photocatalytic activity of ZnO-graphene nanocomposites prepared by microwave synthesis*. Journal of Nanoparticle Research, 2012. **14**(12).
104. Calderon, L.d.A., *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*2012: InTech. 428.
105. Shiao-Wen Tsai, et al., *MG63 Osteoblast-Like Cells Exhibit Different Behavior when Grown on Electrospun Collagen Matrix versus Electrospun Gelatin Matrix*. journal PLOS ONE, 2012. **7**(2).
106. Oliveira, T., *PCR em tempo real: métodos e aplicações*, Tese de mestrado no Departamento de Biologia 2010, Universidade de Aveiro: Aveiro.
107. Mahmood, T. and P.-C. Yang, *Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting*. North American Journal of Medical Sciences, 2012. **4**(9): p. 429-432.
108. Magi, B. and S. Liberatori, *Immunoblotting Techniques*. Methods In Molecular Biology, 2005. **295**: p. 227-253.
109. R.M, P., *In-vitro techniques: can they replace animal testing?* Oxford Journals, 1986. **1**(8): p. 559-560.
110. Marbelia, L., *Suportes à base de quitosano para regeneração óssea*, Tese de Mestrado no Departamento de Física 2011, Universidade de Aveiro: Aveiro.
111. Madihally, S.V. and H.W.T. Matthew, *Porous chitosan scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials, 1999. **20**(12): p. 1133-1142.

112. Pautke, C., et al., *Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts*. *Anticancer Research*, 2004. **24**(6): p. 3743-3748.
113. Clover, J. and M. Gowen, *Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype?* *Bone*, 1994. **15**(6): p. 585-591.
114. Díaz-Rodríguez, L., et al., *Antigenic Phenotype and Phagocytic Capacity of MG-63 Osteosarcoma Line*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009. **1173**: p. E46-E54.
115. Golub, E.E. and K. Boesze-Battaglia, *The role of alkaline phosphatase in mineralization*. *Current Opinion in Orthopaedics*, 2007. **18**: p. 444-448.
116. Pati, F., et al., *Osteoblastic cellular responses on ionically crosslinked chitosan-tripolyphosphate fibrous 3-D mesh scaffolds*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013. **101A**(9): p. 2526-2537.
117. P Jungbluth, M.H., JP Grassmann, J Schneppendahl, A Kessner, M Sager, AR Hakimi, J Becker, J Windolf and M Wild, *The progress of early phase bone healing using porous granules produced from calcium phosphate cement*. *European Journal of Medical Research*, 2010. **15**(5): p. 196-203.
118. Porter, J.R., T.T. Ruckh, and K.C. Popat, *Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies*. *Biotechnology Progress*, 2009. **25**(6): p. 1539-1560.
119. Ribeiro, C.C., C.C. Barrias, and M.A. Barbosa, *Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices*. *Biomaterials*, 2004. **25**(18): p. 4363-4373.
120. Son, J.S., et al., *Porous calcium phosphate granules containing drug-loaded polymeric nanoparticles for bone regeneration*. *Materials Letters*, 2012. **76**(0): p. 243-246.
121. Marzio Piccinini, V.M.S., Francesco Bucciotti, *Synthetic porous calcium phosphate granules for bone substitutes*, in *20th EAO Annual Scientific Congress*, U. Group, Editor 2011: Athens.
122. Jayakrishnan, A. and S.R. Jameela, *Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices*. *Biomaterials*, 1996. **17**(5): p. 471-484.
123. Yong Zhang and M. Zhang, *Microstructural and mechanical characterization of chitosan scaffolds reinforced by calcium phosphates*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2001. **282**(2-3): p. 159-164.

124. Mansur, H.S., et al., *Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels*. Materials Science and Engineering: C, 2009. **29**(5): p. 1574-1583.
125. Lim, L.Y. and L.S.C. Wan, *Heat Treatment of Chitosan Films*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1995. **21**(7): p. 839-846.
126. Elias, C.N., et al., *Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2008. **1**(3): p. 234-242.
127. Macedo, M., et al., *O uso do plasma de nitrogênio para modificação superficial em membranas de quitosano*. Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde, 2011. **1**(2).
128. Wanichapicharta, P., et al., *Characteristics of chitosan membranes modified by argon plasmas*. Surface and Coatings Technology, 2009. **203**(17-18): p. 2531-2535.
129. Beppu, M.M., E.J. Arruda, and C.C. Santana, *Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana*. Polímeros, 1999. **9**: p. 163-169.
130. Daub, C.D., et al., *The influence of molecular-scale roughness on the surface spreading of an aqueous nanodrop*. Faraday discussions, 2010. **146**: p. 67-77.
131. Macedo, M., *Modificação de membranas de quitosana por plasma para uso biológico*, 2009, Universidade Federal do Rio Grande do Norte Centro de Ciências e Tecnologias: Natal.
132. Chen, C., et al., *Enhancement of the Controlled-Release Properties of Chitosan Membranes by Crosslinking with Suberoyl Chloride*. Molecules, 2013. **18**(6): p. 7239-7252.

