

Ana Rita Carvalho de Castro Teixeira Lopes

Desenvolvimento de membranas à base de quitosano para aplicação na região lombar

Dissertação de Mestrado na área da Engenharia Biomédica, orientada pela Professora Doutora Benilde Costa e pela Professora Doutora Patrícia Alves e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Orientadores:

Prof. Dra. Benilde Costa

Prof. Dra. Patrícia Alves



Outubro 2020

“Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los.”

-Isaac Asimov

Agradecimentos

Aproximando-me agora do final do meu percurso académico, não poderia de deixar de deixar de agradecer a todos que de certa forma contribuíram para o meu crescimento, quer a nível académico quer a nível pessoal.

Primeiramente, gostaria de agradecer à Professora Doutora Patrícia Alves e à Professora Doutora Benilde Costa por toda a disponibilidade, conhecimento partilhado e sobretudo por me terem ajudado a encarar este projeto com motivação e perseverança. À Filipa Martins, pela ajuda e paciência durante este projeto. À empresa Artur Salgado, SA, e ao colaborador José Ventura, pela cooperação e contribuição com materiais. Ao Professor Doutor Paulo Gordo, pela cooperação neste projeto, especialmente na ajuda da realização da análise de Espectroscopia de Aniquilação de Positrões.

Agradeço o acesso à Plataforma TAIL-UC financiada por QREN-Mais Centro Project No.ICT_2009_02_012_1890, o que permitiu a realização das análises por Microscopia Eletrónica de Varrimento e a Difração de raios-X.

Este trabalho foi realizado no âmbito dos Centros de Investigação CFisUC (FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., projeto UID/04564/2020) e CIEPQPF (FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., referência UIDB/00102/2020).

Em especial ao meu namorado, Rodrigo, que sempre que me sinto mais desamparada, abre-me os olhos para o caminho certo. Obrigada por todo o esforço e atenção. Foste sempre a pessoa que mais me encheu o coração. Sem o teu sentido de humor não seria a mesma coisa.

Não poderia deixar de agradecer o apoio dos meus amigos, Catarina, Mónica, Filipa, Cláudia, Ricardo, Pedro e António, que me encorajaram muitas vezes e deram mais cor durante estes anos. Catarina, Mónica e Ricardo, vocês são a prova viva que mesmo à distância, uma amizade por durar anos. Aos meus amigos de Coimbra, por terem desvendado comigo os encantos desta Cidade dos Estudantes, desde os cafés no Luna às tardes de estudo no Departamento de Física.

Finalmente, à minha família, em especial, aos meus pais e ao meu irmão Nuno, que acreditaram sempre nas minhas capacidades e fazem de tudo para que eu seja feliz. Aos meus primos, Francisca, Joana e Pedro, que mesmo já sermos crescidos, continuamos a juntar-nos à mesa, em casa da Avó, como se fossemos crianças outra vez. Obrigada por esses momentos felizes. À minha avó também, que nunca se esquece de perguntar como vai a minha vida em Coimbra.

Um obrigada a todos, por certa forma terem entrado na minha vida e terem-me feito crescer não só humanamente, mas intelectualmente também. Esta foi possivelmente a fase mais importante da minha vida. Um bem haja ao fim desta excelente etapa e ao início de outra assim.

Resumo

Nos últimos anos com o aumento da esperança média de vida do ser humano, tem-se associado problemas na coluna vertebral, que têm conduzido à investigação de dispositivos médicos inovadores na área da Engenharia de Tecidos para prática clínica. Contudo, o ambiente natural do tecido ósseo é bastante complexo de ser recriado e não existe nenhum material desenvolvido que possa reproduzir completamente a estrutura original do osso.

A utilização de estruturas tridimensionais porosas, biodegradáveis e biocompatíveis nesta área – *scaffolds* – neste caso denominadas de membranas, tem sido vastamente explorada. Estes *scaffolds* podem ser produzidos a partir de polímeros naturais, sintéticos, cerâmicos e metais. No entanto, a fim de mitigar desperdícios resultantes das indústrias alimentares e preservar o meio ambiente, tem sido encarado como dever cívico otimizar o uso dos produtos provenientes do meio natural. O quitosano é um polissacarídeo de origem natural, encontrado no exosqueleto de crustáceos marinhos e na parede celular dos fungos, com uma enorme popularidade na produção de materiais tridimensionais para Engenharia de Tecidos. Este polímero natural apresenta várias vantagens na produção destas estruturas na regeneração e reparação óssea: biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade e propriedades antimicrobiais.

O presente estudo teve como objetivo produzir membranas porosas à base quitosano com incorporação de fosfatos de cálcio (hidroxiapatite e β -fosfato tricálcico), para aplicação em cirurgias de fusão lombar posterolateral, tendo por base a informação disponível na literatura existente. Numa primeira fase, procedeu-se à preparação das membranas com o quitosano e outro biopolímero (alginato de sódio), visto estes dois formarem um complexo polieletrólito. Noutra segunda fase, foi adicionada a algumas membranas os fosfatos de cálcio, de modo a que no final se possa analisar a diferença entre membranas com ou sem estes cerâmicos. Todos os grupos de membranas foram congelados, liofilizados e posteriormente testados química e fisicamente.

Os quatro grupos de membranas (AQ - membrana polimérica; B, H e BH - membranas compósitas) foram objeto de caracterização pormenorizada, designadamente no que respeita à sua porosidade através do método de etanol, degradação em água destilada, espectroscopia de aniquilação de positrões (EAP) e microscopia eletrónica de varrimento (MEV); à perda de massa, estabilidade térmica através da análise termogravimétrica (TGA) e composição química através da difração de raio-X (DRX) e espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR). Os resultados obtidos puderam aferir que em todas as diferentes membranas foram encontrados microporos, mesoporos e macroporos. A reticulação neste trabalho também teve um contributo importante, sendo que cooperou na obtenção de poros com menores dimensões e maior regularidade na membrana AQ. Também foi possível observar o efeito dos cerâmicos nas membranas compósitas, tanto a nível morfológico como químico. Estas membranas apresentam poros mais heterogéneos e densos, devido à deposição dos fosfatos de cálcio na parede dos poros. No entanto, os resultados são muito preliminares para a aplicação em causa e necessitam ainda de um estudo intensivo na área biológica e mecânica.

Palavras-chave: alginato de sódio, fosfatos de cálcio, fusão lombar posterolateral, liofilização, quitosano, membranas e regeneração óssea.

Abstract

In recent years, the increase in human life expectancy and the back problems that are associated with it, have led to the investigation of innovative medical devices in the Tissue Engineering field for clinical practice. However, the natural environment of the bone tissue is very complex to be recreated and there isn't a developed material that can reproduce the structure of bone origin.

The use of three-dimensional porous, biodegradable and biocompatible structures in this field – *scaffolds* – in this case called membranes, has been extensively explored. These *scaffolds* can be produced from natural polymers, synthetics, ceramics and metals. Though, in order to mitigate waste resulting from food industries and preserve the environment, it has been seen as a civic duty to optimize the use of products from the natural environment. Chitosan is a polysaccharide of natural origin, found in the exoskeleton of marine crustaceans and in the cell wall of fungi, with enormous popularity in the production of three-dimensional materials for Tissue Engineering. This natural polymer has several advantages in the production of these structures in bone regeneration and repair: biodegradability, biocompatibility, non-toxicity and antimicrobial properties.

The present study aimed to fabricate porous membranes based on chitosan with the incorporation of calcium phosphates (hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate), for application in posterolateral lumbar fusion surgeries, based on information available in the existing literature. In the first step, the membranes were prepared with chitosan and another biopolymer (sodium alginate), as these two polymers complement each other. In the second step, calcium phosphates were added to some membranes, so that at the end it can be possible to analyze the difference between membranes with and without these ceramics. All groups of membranes were frozen, lyophilized and subsequently tested chemically and physically.

The four groups of membranes (AQ - polymeric membranes; B, H and BH - composite membranes) were object of detailed characterization, namely with regard to their porosity through the ethanol method, degradation in distilled water, positron annihilation spectroscopy (PAS) and scanning electronic microscope (SEM); lost mass and thermal stability through thermogravimetric analysis (TGA); and chemical composition through X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The results obtained showed that mesopores, micropores and macropores were found in all the different membranes micropores. The crosslinking in this work also had an important contribution, being that it cooperated in obtaining pores with smaller dimensions and greater regularity in the AQ membrane. It was also possible to observe the effect of ceramics on composite membranes, both morphologically and chemically. However, the results are very introductory for the application in question and still require research in the biological and mechanical fields.

Keywords: calcium phosphates, chitosan, bone regeneration, lyophilization, membranes, posterolateral lumbar fusion, sodium alginate.

Índice de matérias

Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xix
Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Objetivos e Estrutura da tese	1
Capítulo 2. Revisão do Estado de Arte	3
2.1. Tecido ósseo	3
2.1.1. Organização estrutural do tecido ósseo.....	4
2.1.2. Reparação e regeneração óssea.....	5
2.1.3. Fusão Lombar na coluna vertebral	8
2.2. Engenharia de tecidos ósseos (ETO).....	10
2.2.1. Biomateriais para reparação de tecido ósseo	15
2.2.2. De Membrana a implante médico	18
2.2.3. Polímeros Naturais	20
2.2.3.1. Polissacarídeo: Quitosano	21
2.2.3.2. Polissacarídeo: Alginato de Sódio.....	25
2.2.4. Biocerâmicos.....	29
2.2.4.1. Hidroxiapatite	31
2.2.4.2. β -Fosfato Tricálcico.....	33
2.2.4.3. Biocompósitos com fosfatos de cálcio.....	35
2.2.5. Reticulação Química	39
2.2.5.1. Glioxal – Agente Reticulante	40
2.2.6. Técnicas de Fabrico de Membranas.....	41
Capítulo 3. Materiais e Métodos	45
3.1. Preparação das Membranas para a Regeneração Óssea.....	45
3.1.1. Reagentes Químicos	45
3.1.2. Procedimento Experimental.....	46
3.2. Técnicas de Caracterização Morfológica e Físico-Química das Membranas	53
3.2.1. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR)	53
3.2.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)	54
3.2.3. Porosidade pelo Método do Etanol.....	54
3.2.4. Teste de Degradação em Água Destilada	55
3.2.5. Análise Termogravimétrica (TGA)	55

3.2.6. Difração de Raios-X (DRX).....	55
3.2.7. Espectroscopia de Aniquilação de Positrões (EAP).....	57
Capítulo 4. Análise e Discussão de Resultados.....	61
4.1. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR).....	61
4.2. Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV).....	64
4.3. Determinação da Porosidade pelo Método do Etanol	66
4.4. Teste de Degradação em Água Destilada.....	67
4.5. Análise Termogravimétrica (TGA).....	69
4.6. Difração de Raios-X (DRX)	72
4.7. Espectroscopia de Aniquilação de Positrões	74
Capítulo 5. Discussão de Resultados	77
Capítulo 6. Conclusão.....	79
Capítulo 7. Trabalhos Futuros.....	81
Referências Bibliográficas	83
ANEXOS.....	1

Índice de Figuras

Figura 2.1 Componentes celulares do tecido ósseo (adaptada de Saravanan <i>et al.</i> , 2016)...	4
Figura 2.2 Organização hierárquica dos componentes estruturais do tecido osso (adaptada de Henkel <i>et al.</i> , 2013; Venkatesan <i>et al.</i> , 2015).	5
Figura 2.3 Esquema das fases inerentes à remodelação de tecido.	6
Figura 2.4 Remodelação do tecido osso, pela <i>BMU</i> . Primeiro, ocorre a ativação de osteoclastos, que irão, por conseguinte, reabsorver o osso. Aquando desta reabsorção óssea, os osteoblastos começam a aparecer e a formar novo osso (adaptada de Fuchs <i>et al.</i> , 2009).	7
Figura 2.5 Estrutura da coluna vertebral de um ser humano (adaptada de Pina <i>et al.</i> , 2019).	8
Figura 2.6 Fusão posterolateral na coluna vertebral, especificamente na zona lombar (adaptada de Omid-Kashani <i>et al.</i> , 2014).	9
Figura 2.7 Medicina Regenerativa baseada no uso de <i>scaffolds</i> (adaptada de Ikada, 2006).	12
Figura 2.8 Componentes da área de engenharia de tecidos.	12
Figura 2.9 A membrana absorve iões de cálcio, proteínas e osteoblastos, de forma a promover formação óssea e deposição óssea. Numa fase inicial há mineralização e formação de apatite, até se formar uma estrutura óssea lamelar na área defeituosa (adaptada de Lu <i>et al.</i> , 2016).....	14
Figura 2.10 Evolução dos biomateriais em ETO (adaptada de Allo <i>et al.</i> , 2012).....	17
Figura 2.11 Várias etapas de um dispositivo médico até à sua comercialização no mercado.	18
Figura 2.12 Estrutura química da quitina e do quitosano, em que há formação do quitosano, a partir da reação química de desacetilação. Protonação do quitosano em ambiente ácido.	22
Figura 2.13 Gráfico da evolução do uso de quitosano ao longo dos anos em aplicações de reparação óssea (adaptada de Venkatesan & Kim, 2014).....	24
Figura 2.14 Estrutura química do alginato com os seus respetivos blocos (retirada de Daemi & Barikani, 2012).....	25
Figura 2.15 Gráfico da evolução ao longo dos anos de estudos publicados com o uso do polímero Alginato em (a) engenharia de tecidos e (b) especificamente em aplicações no tecido ósseo (adaptada de Venkatesan <i>et al.</i> , 2015).	26
Figura 2.16 Interação química entre as partículas carregadas positivamente do quitosano e negativamente do alginato numa mistura.	27
Figura 2.17 Esquema dos eventos entre a interface do implante-biocerâmicos e o ambiente biológico envolvente: (1) dissolução das biocerâmicos; (2) precipitação da solução; (3) mudança iónica e rearranjo estrutural na interface tecido/biocerâmico; (4) interdifusão a partir da camada limite da superfície para as biocerâmicos; (5) efeitos da solução mediada através da atividade celular; (6) deposição da superfície (a) inorgânica ou (b) orgânica; (7) deposição com a integração dos biocerâmicos; (8) quimiotaxia da superfície do biocerâmico; (9) anexação celular e proliferação; (10) diferenciação celular; (11) formação de matriz extracelular (retirada de Dorozhkin, 2010).....	30

Figura 2.18 Estrutura química da hidroxiapatite (retirada de Monreal Romero <i>et al.</i> , 2013)..	31
Figura 2.19 Interação química entre o quitosano-hidroxiapatite (retirada de Venkatesan & Kim, 2010).....	32
Figura 2.20 Estrutura química do β -TCP.	33
Figura 2.21 Esquema da rede 3D de um <i>scaffold</i> (membrana) polimérico reticulado quimicamente (adaptada de Krishnakumar <i>et al.</i> , 2019).....	39
Figura 2.22 Estrutura química do glioxal (agente reticulante) (retirada de Yang <i>et al.</i> , 2005).	40
Figura 2.23 Mecanismo de reticulação do glioxal com o polímero de quitosano, (a) glioxal reage com os grupos hidroxil do quitosano, (b) glioxal reage com os grupos amina do quitosano (retirada de Yang <i>et al.</i> , 2005).....	40
Figura 3.1 Diagrama de fluxo das várias etapas do método experimental das membranas para regeneração óssea.....	47
Figura 3.2 Dissolução da solução de alginato de sódio e quitosano.	48
Figura 3.3 Representação esquemática da interação molecular entre o alginato de sódio e o quitosano (adaptada de Sg & Sh, 2017; Gierszewska <i>et al.</i> , 2018).	49
Figura 3.4 Interação química entre o quitosano e a nanohidroxiapatite e mecanismo de reação entre os polímeros e a nanohidroxiapatite (adaptada de Gierszewska <i>et al.</i> , 2018; Liao <i>et al.</i> , 2018).....	50
Figura 3.5 Amostras de alginato de sódio e quitosano (AQ) com a adição de fosfatos de cálcio (B, H e BH), visualizando-se a cor esbranquiçada.....	50
Figura 3.6 Mecanismo de interação entre a rede polimérica (quitosano-alginato) e os íões de fosfato de cálcio, mais o agente de reticulação, o glioxal (adaptada de Pighinelli <i>et al.</i> , 2015; Baran, 2016; Gierszewska <i>et al.</i> , 2018).....	51
Figura 3.7 Etapa de congelamento e liofilização com os diferentes tipos de membranas em estudo.	52
Figura 3.8 Espectrómetro utilizado no trabalho.	53
Figura 3.9 Amostras em etanol no dessecador de vácuo.	54
Figura 3.10 Representação esquemática do fenómeno da difração de Raio-X (Lei de Bragg).	56
Figura 3.11 Esquema do decaimento do isótopo ^{22}Na	58
Figura 3.12 Sistema PALS experimental utilizado	59
Figura 4.1 Espetros FTIR dos reagentes (a) alginato de sódio (b) quitosano e (c) membrana AQ1.....	61
Figura 4.2 Espetros FTIR das membranas (a) AQ, (b) H, (c) B e (d) BH.	63
Figura 4.3 Imagens recolhidas por MEV da superfície da cada membrana com 250x: a) AQ (alginato de sódio-quitosano); b) B (alginato de sódio-quitosano & β -TCP); c) BH (alginato de sódio-quitosano & hidroxiapatite e β -TCP); d) H (alginato de sódio-quitosano & hidroxiapatite).....	64
Figura 4.4 Imagens recolhidas por MEV da secção da cada membrana com 250x: a) AQ (alginato de sódio-quitosano); b) B (alginato de sódio-quitosano & β -TCP); c) BH (alginato de sódio-quitosano & hidroxiapatite e β -TCP); d) H (alginato de sódio-quitosano & hidroxiapatite).....	66

Figura 4.5 Esquema cronológico de cada grupo-teste.....	68
Figura 4.6 Curvas de TGA obtidas para as (a) membranas de <i>AQ</i> , <i>BH</i> , <i>H</i> e <i>B</i> ; representação da derivada da perda de massa em função da temperatura das membranas (b) <i>AQ</i> , (c) <i>B</i> , (d) <i>H</i> e (e) <i>BH</i>	69
Figura 4.7 (a) DRX dos materiais usados para produção das membranas: alginato de sódio, quitosano, nHAP e β -TCP; (b) DRX das membranas em estudo: <i>AQ</i> , <i>BH</i> , <i>B</i> e <i>H</i>	72
Figura 4.8 Espectro de tempo de vida do e^+ obtido da amostra <i>H</i> (como os espectros das restantes membranas eram semelhantes só se colocou desta amostra).....	74

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Composição da fase inorgânica do tecido ósseo num adulto (adaptada de Jeong <i>et al.</i> , 2019).	3
Tabela 2.2 Comparação entre os autoenxertos, aloenxertos e membranas com biocerâmicos em implantes de regeneração de tecido osso (adaptada de Spivak & Hasharoni, 2001; Bròdano <i>et al.</i> , 2014; Gupta <i>et al.</i> , 2015).....	11
Tabela 2.3 Tamanho dos poros em membranas 3D com associação ao seu efeito e função em aplicações biomédicas (adaptada de Dorozhkin, 2010; Gomez <i>et al.</i> , 2018).....	15
Tabela 2.4 Comparação dos vários tipos de biomateriais usados em aplicações biomédicas, em membranas para engenharia de tecidos ósseo (adaptada de Elgali <i>et al.</i> , 2017; Qu, 2019).....	17
Tabela 2.5 Tabela de produtos comercialmente disponíveis como substitutos de enxerto ósseo.	19
Tabela 2.6 Influência nas características biológicas do quitosano aquando maior grau de desacetilação (adaptada de Hussain <i>et al.</i> , 2014; Rodríguez-Vázquez <i>et al.</i> , 2015).....	22
Tabela 2.7 Observações de algumas propriedades do complexo quitosano/alginate de sódio (AQ) em estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	28
Tabela 2.8 Comparação entre a Hidroxiapatite (HAp) e o β - fosfato tricálcico (β -TCP) (adaptada de Spivak & Hasharoni, 2001; Epstein, 2009; Bagher <i>et al.</i> , 2012; Wongwitwichot <i>et al.</i> , 2014; Wang & Yeung, 2017; Xu <i>et al.</i> , 2017; Bi <i>et al.</i> , 2019)	34
Tabela 2.9 Resultados de vários estudos com os materiais usados neste trabalho.....	35
Tabela 2.10 Métodos convencionais para fabrico de <i>scaffolds</i> com base polimérica em engenharia de tecidos.	42
Tabela 3.1 Lista dos reagentes químicos utilizados e suas especificações.	45
Tabela 3.2 Proporção usada por cada reagente químico no método experimental da mistura inicial.	48
Tabela 4.1 Picos (cm^{-1}) de absorção referentes ao espectro de FTIR do polímero de alginate de sódio na Figura 4.1 (a) (Liao <i>et al.</i> , 2018; Daemi & Barikani, 2012; Kulig <i>et al.</i> , 2016).....	62
Tabela 4.2 Picos de absorção (cm^{-1}) referentes ao espectro de FTIR do polímero de quitosano da Figura 4.1 (b) (Queiroz <i>et al.</i> , 2015; Kulig <i>et al.</i> , 2016; Nazeer <i>et al.</i> , 2017; Liao <i>et al.</i> , 2018).	62
Tabela 4.3 Valor médio porosidade de cada membrana e respetivos desvios padrões.	66
Tabela 4.4 Tipo de membrana e respetivas massas iniciais.	67
Tabela 4.5 Temperaturas de decomposição térmicas (baseados nos estágios térmicos) das membranas AQ, BH, H e B.	71
Tabela 4.6 Percentagem de massa perdida ao longo dos picos e resíduo inicial/final de cada tipo de membrana em análise (AQ, BH, H e B).	71
Tabela 4.7 Valores τ_1 , τ_2 , τ_3 e τ_4 , e respetivas intensidades para cada membrana em análise.....	75

Tendo o valor τ_3 , pela equação (4) no Capítulo 3 – subcapítulo 3.2.7., pode-se calcular o raio (R) do volume livre na estrutura para cada membrana, e assim sabendo o raio, pode-se calcular o volume livre pela equação (5). De modo, a calcular o raio recorreu-se a uma pequena rotina em Matlab (ANEXO D), esta rotina pede a introdução do valor τ_3 (ns) e calcula o raio R associado a este em Å e o volume livre em Å³75

Tabela 4.8 Valor do volume livre associado ao raio R com ajuda da rotina de Matlab.75

Tabela 5.1 Sistematização do tamanho dos poros encontrados nos diferentes tipos de membrana e nível de porosidade (grau de observação (+)).78

Lista de Símbolos e Abreviaturas

α -TCP	alfa-Fosfato Tricálcico
AS	Alginato de Sódio
AQ	Alginato de Sódio-Quitosano – membrana
B	Alginato de Sódio-Quitosano & β - Fosfato de Tricálcio – membrana
H	Alginato de Sódio-Quitosano & nanohidroxiapatite – membrana
BH	Alginato de Sódio-Quitosano & β - Fosfato de Tricálcio- nanohidroxiapatite – membrana
TGA	Análise Termogravimétrica
β -TCP	β - Fosfato Tricálcico
CPE	Complexo Polieletrólito
DRX	Difração de Raios-X
e^-	Elétrão
ETO	Engenharia de Tecidos Óssea
EAP	Espetroscopia de Aniquilação de Positrões
FTIR	Espetroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier
TCP	Fosfato Tricálcico
CaP	Fosfatos de Cálcio
GD	Grau de Desacetilação
HAp	Hidroxiapatite
MEV	Microscopia Eletrónica de Varrimento
nHAp	Nanohidroxiapatite
Q	Quitosano
e^+	Positrão
Ps	Positrónio
V1	Volume de Etanol Conhecido
V2	Volume Total após Vácuo
V3	Volume Residual

Capítulo 1. Introdução

1.1. Objetivos e Estrutura da tese

No sentido de dar continuidade ao trabalho/pesquisa realizado em “*Desenvolvimento de Adesivos À Base de Quitosano e Fosfato de Cálcio para a Regeneração óssea*” pela aluna Vanessa Raquel Valença de Almeida, foi projetado este tema de trabalho. A formulação das membranas como a seleção do biopolímero a adicionar ao quitosano e respetiva proporção, a seleção da concentração/proporção dos fosfatos de cálcio a incorporar e seleção do reticulante a usar foram definidos com base nesse trabalho.

O presente trabalho teve como principal objetivo a produção de membranas (*scaffolds*) para a regeneração óssea, mais especificamente na zona lombar da coluna. Durante vários anos, a regeneração e a reparação do tecido ósseo constitui um problema clínico. A cirurgia ortopédica é das cirurgias que mais procura médica tem assistido nos últimos anos. De forma a contornar estes problemas, este ramo da Medicina usa enxertos ósseos com a finalidade de estimular o crescimento deste tipo de tecido no local do implante. Apesar destes materiais substitutos serem vastamente usados, têm alguns problemas associados. Por isso, há cada vez mais interesse e investimento no desenvolvimento de materiais artificiais para substituição óssea em Engenharia de Tecidos.

A área de Engenharia de Tecidos é uma área promissora, que usa matrizes poliméricas, cerâmicos ou compósitos, com o propósito de promover a adesão, proliferação e diferenciação celular. As matrizes assistem como estruturas tridimensionais temporárias, funcionando como suporte para o crescimento de células. Após a implantação desta matriz (*scaffold*) no paciente, esta começa a degradar-se enquanto um novo órgão/tecido é formado, com a preferência a uma taxa de degradação do material correspondente à taxa de formação de tecido novo.

O quitosano (Q) foi o material base escolhido na projeção destas matrizes, devido às suas propriedades como: não-toxicidade, boa biodegradabilidade, biocompatibilidade, características hemostáticas e antimicrobiais, que são vantajosas para a aplicação. A utilização deste polissacarídeo com outro, neste caso o alginato de sódio (AS), tem como finalidade solucionar algumas limitações do quitosano, como irá ser descrito no **Capítulo 2**. A reticulação destes compostos foi feita com glicolal. Tendo em conta o osso humano ser consistido por matrizes de colagénio e nanocristais de hidroxiapatite, logo o plano mais viável para obter-se materiais artificiais com a finalidade de substitutos ósseos, é a produção de compósitos com fosfatos de cálcio: nanohidroxiapatite (nHAp) e β -fosfato tricálcico (β -TCP).

No **Capítulo 3** começa-se por listar os materiais utilizados neste trabalho e descrever o procedimento experimental para a preparação das membranas liofilizadas. De seguida, apresentam-se as técnicas de caracterização: microscopia eletrónica de varrimento (SEM), caracterização térmica por análise termogravimétrica (TGA), difração de raio-X (DRX), espectroscopia de infravermelhos (FTIR), espectroscopia de aniquilação de positrões (EAP), teste de degradação em água destilada e método de porosimetria pelo método do etanol.

Os resultados obtidos de acordo com as técnicas de caracterização acima descritas encontram-se no **Capítulo 4**. A discussão de resultados mais e considerações gerais deste trabalho localizam-se no **Capítulo 5**, e no **Capítulo 6** é apresentada a conclusão geral. Por fim, no **Capítulo 7**, são feitas algumas sugestões resumidas de trabalhos futuros no tema em desenvolvimento.

É de referir que devido à pandemia Covid-19 alguns testes de caracterização que foram previamente pensados e discutidos, nomeadamente hemacompatibilidade e testes mecânicos, não foram realizados devido à necessidade de finalização do curso. Para além disto, este projeto também idealizada a incorporação de um fármaco, a *Vancomycin*, nestas membranas, bem como a análise da libertação deste. Contudo, no **ANEXO A** encontram-se os fundamentos teóricos referentes à incorporação de fármacos em *scaffolds* e da sua libertação, visto já ter sido feita a pesquisa antes da pandemia.

Capítulo 2. Revisão do Estado de Arte

2.1. Tecido ósseo

O esqueleto humano é composto por cerca de 206 ossos, tendo estes ossos diferentes aparências. O osso é um material compósito constituído por uma matriz orgânica-inorgânica e água (Henkel et al. 2013). A parte orgânica consiste em 30% do total do osso, o seu principal constituinte é o colagénio tipo I (>90%), fazendo ainda parte proteoglicanos e glicoproteínas, que contribuem significativamente para as atividades biológicas, conferindo integridade à estrutura do osso (Russo et al., 2014; Gomez et al., 2018). A parte inorgânica contribui em 65%-70%, e é predominantemente composta por hidroxiapatite de cálcio ($Ca_{10}(PO_4)(OH_2)$) (Fuchs et al., 2009), servindo de armazenamento de reservatório de iões (cálcio, fósforo, magnésio e sódio). Estes materiais inorgânicos formam estruturas cristalinas com as fibras de colagénio, com as quais adquirem a propriedade famosa de rigidez e suporte (Fuchs et al., 2009; Venkatesan et al., 2015). Na Tabela 2.1 encontram-se alguns dos constituintes desta fase. No entanto, esta sua estrutura inorgânica confere fragilidade e baixa resistência à fratura (Russo et al., 2014). Os cristais de hidroxiapatite contêm impurezas, as mais comuns compreendem carbonatos em vez de grupos fosfatos. Também os iões de cálcio podem ser substituídos por potássio, magnésio e sódio, acreditando-se que estas alterações diminuem a cristalinidade do osso, e consequentemente propriedades minerais como a solubilidade, importante para a homeostase mineral (Feng, 2010). A água é o terceiro elemento da sua constituição. Contudo, a taxa de volume hidroxiapatite-colagénio-água e a fração de peso destes não são constantes, pois variam com a idade e espécies específicas (Venkatesan et al., 2015).

Tabela 2.1 Composição da fase inorgânica do tecido ósseo num adulto (adaptada de Jeong et al., 2019).

Cálcio [wt.%]	Fósforo [wt.%]	Sódio [wt.%]	Magnésio [wt.%]	Potássio [wt.%]	Carbonato [wt.%]	Fluoreto [wt.%]	Cloreto [wt.%]	Pirofosfato [wt.%]
34.8	15.2	0.9	0.72	0.03	7.4	0.03	0.13	0.07

O colagénio, pertencente à fase orgânica, é uma molécula tripla helicoidal contendo três cadeias polipeptídicas, cada uma composta por cerca de 100 aminoácidos. Estas cadeias são reticuladas por ligações de hidrogénio, onde formam uma molécula linear com cerca de 300 nm de comprimento. Por sua vez, estas moléculas são alinhadas paralelamente, a fim de formar fibrilas de colagénio, que são finalmente agrupadas em fibras de colagénio (Feng, 2010).

O osso é uma forma extremamente dinâmica de tecido conjuntivo. A sua matriz óssea é uma matriz que se encontra calcificada, ou seja, tem os seus componentes extracelulares mineralizados. Tem inúmeras funções: mecânicas (proteção, forma, movimento e locomoção), sintéticas (síntese de células sanguíneas), metabólicas (armazenamento de minerais para regular a homeostase do cálcio e do fosfato nos fluídos corporais) e regulação do pH do sangue (Venkatesan et al., 2015; Henkel et al., 2013; Ansari, 2019). No osso existem três

tipos de células dominantes como é visto na Figura 2.1 (Marie, 1992; Fuchs *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2018; Ansari, 2019; Bow *et al.*, 2019):

- Osteoblastos: células que sintetizam e libertam matéria orgânica do osso, responsáveis pela formação, crescimento e mineralização do tecido ósseo. São localizados ao longo da superfície do osso, compreendendo entre 4-6% das células residentes do osso e têm origem nas células estaminais mesenquimais.
- Osteoclastos: células grandes com mais de um núcleo (multinucleados), oriundas de células estaminais hematopoéticas. Apresentam um papel fundamental na reabsorção óssea, reabsorvem osso que perde “vigor”, de modo a manter a homeostase óssea. Irregularidades na atividade destes podem levar a doenças como a osteoporose.
- Osteócitos: células mais abundantes do osso (90-95%) com uma duração de vida maior que 25 anos, derivadas de osteoblastos maduros, são encontradas inerentes ao osso em cavidades denominadas lacunas. Estes são cruciais na comunicação do tecido e na regulação do equilíbrio entre os agentes de remodelação.
- Células osteoprogenitoras: células de reserva, encontrando-se inativas, que podem ser estimuladas a diferenciar-se em osteoblastos para formação de matriz óssea.



Figura 2.1 Componentes celulares do tecido ósseo (adaptada de Saravanan *et al.*, 2016).

2.1.1. Organização estrutural do tecido ósseo

Quanto à sua organização macroestrutural, o osso é composto por osso compacto 80% (denso ou cortical) ou trabecular 20% (esponjoso) (Fuchs *et al.*, 2009; Henkel *et al.*, 2013). O osso compacto apresenta uma estrutura densa e encontra-se mais à superfície (Gomez *et al.* 2018), tendo este baixa porosidade, enquanto que o trabecular apresenta alta porosidade, a sua estrutura encontra-se preenchida por cavidades e é localizado nas áreas mais profundas do osso (Fuchs *et al.*, 2009; Henkel *et al.*, 2013).

A nível microscópico, o osso consiste também em duas categorias, em osso primário/imaturo ou osso secundário/maduro/lamelar. O primário existe na fase de embrião, no recém-nascido e na cicatrização óssea, ou seja, nos primeiros estágios do osso. As suas fibras de colagénio estão dispostas com os osteócitos de forma aleatória. A remodelação de osso primário dá origem, por sua vez, a osso secundário, onde as fibras de colagénio já se encontram de forma organizada, denominadas por lamelas (Fuchs *et al.*, 2009; Henkel *et al.*, 2013).

A nível nanoestrutural, as estruturas mais importantes são as fibras de colagénio, cercadas e infiltradas por minerais. Esta fase mineral é constituída pelos cristais de cálcio, sob a forma de hidroxiapatite. As fibras de colagénio conferem elasticidade ao tecido, bem como algumas capacidades de resistência à propagação de fissuras. Os cristais como já dito antes, conferem dureza e resistência à compressão. No nível subnanoestrutural, os três principais materiais incluem os cristais ósseos, moléculas de colagénio e proteínas orgânicas não-colagénicas (Henkel *et al.*, 2013). Na Figura 2.2 encontram-se os vários tipos de componentes da estrutura do osso hierarquicamente.

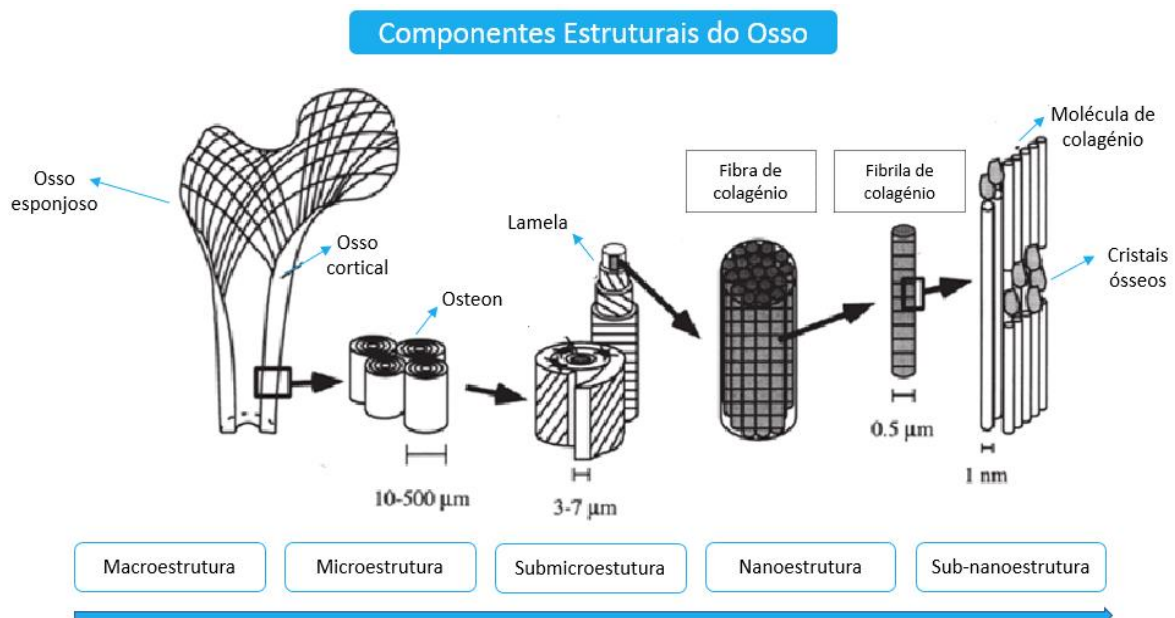


Figura 2.2 Organização hierárquica dos componentes estruturais do tecido osso (adaptada de Henkel *et al.*, 2013; Venkatesan *et al.*, 2015).

2.1.2. Reparação e regeneração óssea

O tecido ósseo é altamente organizado, apesar da sua aparência inerte, sofre remodelações contínuas, de forma a adaptar-se às mudanças a que está sujeito. Quando sofre lesões possui capacidade regenerativa, isto é, tem um processo de autoreparação, em que há formação de novo tecido ósseo e não formação de tecido fibroso. Esta regeneração

fornece um tecido sem cicatrizes, de modo a preservar a sua integridade, otimizar a sua função e prevenir a sua degradação a longo prazo, por um sistema complexo de controlo hormonal e fatores físicos. Sempre que uma fratura ocorre, não só existe uma quebra da integridade do esqueleto, mas existe também uma disrupção nas estruturas vasculares, conduzindo à redução de oxigénio, nutrientes e condicionamento de medula óssea no local da fratura (Fuchs *et al.*, 2009). A reparação óssea deste local lesado acontece por três eventos intercalados (Fuchs *et al.*, 2009; Ansari, 2019):

1. Inflamação;
2. Reparação óssea;
3. Remodelação óssea.

A fase inicial é caracterizada pela formação de um coágulo sanguíneo devido ao rompimento de vasos sanguíneos e infiltração de células inflamatórias. Estas últimas vão induzir a migração de osteoblastos para o local do ferimento de forma a formar novo osso. A remodelação óssea é um ciclo que compreende uma série de eventos ordenados, que irão substituir/reconstruir uma zona defeituosa, havendo um processo cooperativo entre os osteoblastos e osteoclastos como esquematizado na Figura 2.3. Os osteoclastos têm o papel de reabsorver osso desnecessário/antigo/danificado, para que depois os osteoblastos possam assim produzir o novo osso (Fuchs *et al.*, 2009; Ansari, 2019). A remodelação pode ocorrer em resposta a forças mecânicas, denominando-se remodelação orientada (30%) ou pode ocorrer ainda em resposta hormonal, apresentando uma localização aleatória, por isso denominando-se remodelação não-orientada (70%). Independentemente do tipo cada uma delas, estas conduzem para o mesmo fim, permitir que o osso possa estabelecer a sua função e atingir o equilíbrio ósseo (Fuchs *et al.*, 2009). O ciclo da remodelação consiste também em três fases (Marie 1992):

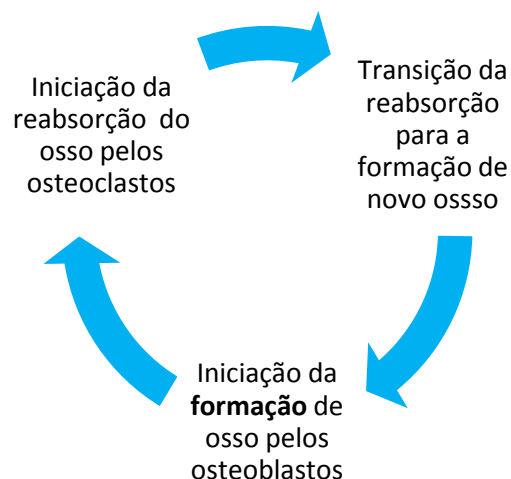


Figura 2.3 Esquema das fases inerentes à remodelação de tecido.

É um processo coordenado devido à ação destes dois tipos de células constituintes do osso, osteoclastos e osteoblastos, que temporariamente formam uma estrutura anatómica, *Basic Multicellular Unit (BMU)*, (Marie, 1992; Fuchs *et al.*, 2009). A operação destes agentes de remodelação estrutural depende fortemente do fluxo de sinais químicos produzidos pela

matriz extracelular na forma de proteínas e fatores de crescimento, que por sua vez estimulam cascatas de sinalização responsáveis pelo recrutamento e diferenciação de células precursoras ósseas durante todo o processo de reparo (Bow *et al.*, 2019). A remodelação dá-se primeiramente pela ativação de precursores de osteoclastos que são estimulados a diferenciar-se em osteoclastos ativos, para depois ocorrer a reabsorção do osso por estes. Este processo está esquematizado na Figura 2.4. A remodelação é dependente do tempo com que a *BMU* viaja pelo tecido, denominado por “período sigma”. Este período quantifica os dias que o processo de remodelação dura, normalmente dura 120 dias. Destes 120 dias, 20 dias são gastos na iniciação e aumento do diâmetro da reabsorção pelos osteoclastos, seguido de 10 dias de reversão e, finalmente 90 dias de deposição de matriz óssea pelos osteoblastos (Marie, 1992; Fuchs *et al.*, 2009).

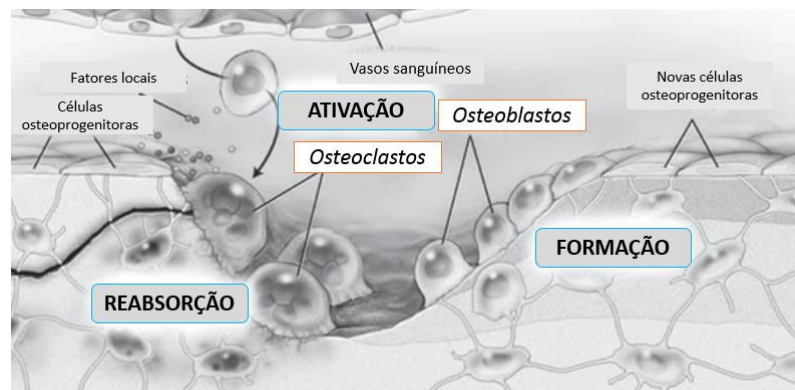


Figura 2.4 Remodelação do tecido osso, pela *BMU*. Primeiro, ocorre a ativação de osteoclastos, que irão, por conseguinte, reabsorver o osso. Aquando desta reabsorção óssea, os osteoblastos começam a aparecer e a formar novo osso (adaptada de Fuchs *et al.*, 2009).

A idade, doenças, mobilidade reduzida são alguns dos fatores que podem alterar o equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea. Dietas em baixos valores minerais são também um dos fatores para contribuir para um mau funcionamento metabólico, sendo que o cálcio coopera na regulação de formação e reabsorção de osteoclastos, como também minerais de fósforos que regulam a diferenciação e crescimento de osteoblastos (Jeong *et al.*, 2019). É importante existir um equilíbrio na formação e reabsorção do osso para que não resultem doenças, por exemplo a osteoporose que advém de um desequilíbrio ósseo. A osteoporose é das doenças mais comuns em pessoas idosas, resultando numa reabsorção excessiva de tecido pelos osteoclastos, sem que haja balanço na formação de novo tecido pelos osteoblastos, contribuindo assim para a perda óssea. Em contrário, ocorre a osteopetrose (Marie, 1992; Fuchs *et al.*, 2009).

Concomitantemente, o osso é um tecido que cresce, remodela-se e mantém-se ativo durante a vida num organismo.

2.1.3. Fusão Lombar na coluna vertebral

A coluna vertebral consiste em sete vértebras cervicais, doze torácicas, cinco lombares, o sacro que compreende cinco vértebras fundidas e o cóccix formado pela fusão de quatro ou mais vértebras rudimentares como é visto na Figura 2.5 (Jacob, 2002).

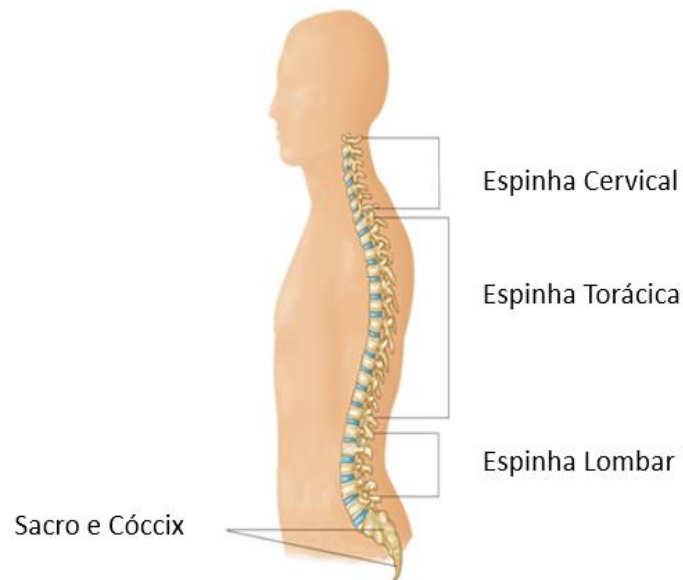


Figura 2.5 Estrutura da coluna vertebral de um ser humano (adaptada de Pina *et al.*, 2019).

As vértebras lombares têm a função de suportar a maioria do peso corporal, daí a sua forma. Para além disto, é a região mais flexível da coluna vertebral, possuindo uma estrutura biomecânica pobre inerente e contém ainda raízes nervosas vulneráveis a lesões ou doenças (Lewis *et al.*, 2016; Jacob, 2002). Devido a estes fatores, a dor causada na zona lombar é um dos motivos mais comuns para procura de atendimento médico, afetando mais de um quarto a população adulta nos Estados Unidos da América (Parker *et al.*, 2014; Benson, 1991). Lesões ou doenças degenerativas na coluna vertebral, mais propriamente na zona lombar, têm um efeito nefasto na funcionalidade e na qualidade de vida de um indivíduo, e têm sido reportadas como umas das maiores contribuidoras para a perda de dias de trabalho (Parker *et al.*, 2014). Vários fatores de risco estão associados com a dor lombar como o excesso de peso, má postura, *stress*, tabagismo, falta de tonificação muscular e genética familiar (Lewis *et al.*, 2016).

De modo a aliviar esta dor, recorre-se à fusão lombar, tema em estudo deste trabalho, que é aplicada a doenças degenerativas do disco ou instabilidade da coluna que ocorreram por trauma, infeções ou pela rotina diária (Lewis *et al.*, 2016). Mais de 298000 cirurgias à fusão lombar ocorrem anualmente nos Estados Unidos da América, custando mais de 11\$ biliões por ano (Starkweather *et al.*, 2008).

Segundo a Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos (AAOS), a fusão espinal (artrodese) é uma técnica cirúrgica usada de modo a corrigir problemas associados com os ossos da coluna, as vértebras. O conceito tem por base fundir duas ou mais vértebras, causadoras de dor, numa só. Há vários tipos de fusões, sendo a mais comum a fusão lombar posterior. O procedimento inicia-se pela remoção de osso artrítico ou outras estruturas que

podem estar a pressionar os nervos na espinha. Este procedimento denomina-se descompressão ou laminectomia. Após este passo, o cirurgião insere um tecido ósseo secundário, os enxertos, entre as vértebras em questão, mais especificamente entre os processos transversais ou perto das articulações após a descompressão (fusão posterolateral), a fim de estimular o crescimento ósseo. De seguida, há colocação de instrumentação específica nos segmentos da espinha como representada na Figura 2.6, a fim de uma fusão mais sólida, como parafusos, hastes ou barras para proporcionar maior estabilidade à coluna, para que se suceda uma fusão entre as vértebras mais rápida¹ (Russo *et al.*, 2014). A fusão das vértebras está dependente da osteoindutividade, osteocondutividade e propriedades bioativas de enxertos ou dos materiais substitutos (Spivak & Hasharoni, 2001; Brødano *et al.*, 2014).

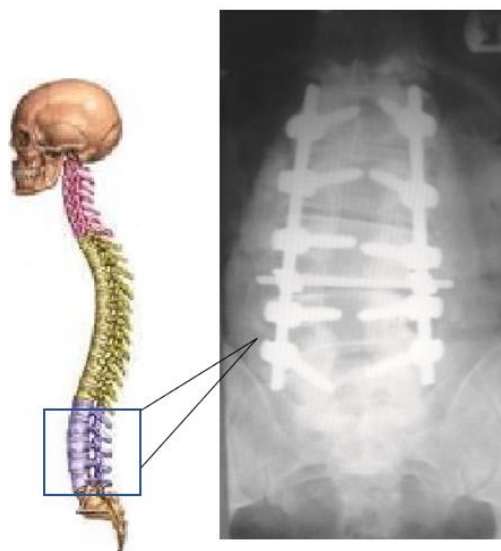


Figura 2.6 Fusão posterolateral na coluna vertebral, especificamente na zona lombar (adaptada de Omid-Kashani *et al.*, 2014).

O processo de cicatrização e consequente neoformação de osso no local da fusão, é complexo e difícil de sequenciar. A incorporação de enxerto leva a uma resposta inflamatória que pode durar até 14 dias, onde há formação de um hematoma, sendo o local depois revascularizado, e só no final é depositado osso. Esta neoformação compreende um procedimento de substituição de cimentos de fosfatos de cálcio (CaP) por fases orgânicas e minerais encontradas no tecido osso. Uma das primeiras células a surgirem são os osteoblastos e macrófagos. A reconstrução do osso pode demorar até um ano a finalizar e muitas das vezes este processo é inibido por incompatibilidade e histocompatibilidade do enxerto implantado. Ou seja, pode estar subentendido a possível formação de pseudoartrose (5%-35%), que causa dor, instabilidade e incapacidade na coluna (Russo *et al.*, 2014). Para se realizar a artrodese com sucesso, o enxerto deve demonstrar capacidades bioativas e ser capaz de suportar forças de carregamento que atuem na coluna vertebral aquando o processo de fusão. Afirma-se que a transmissão de tensões promove a fusão, visto o osso ser mecano-

¹ <https://www.orthoinfo.aaos.org/en/treatment/spinal-fusion> (visto a 28.01.2020)

receptor (Henkel *et al.*, 2013). Porém, o excesso destas pode vir a ser prejudicial. Um balanço nas cargas mecânicas fisiológicas é crucial para o sucesso na reconstrução de tecido osso (Russo *et al.*, 2014).

Apesar do aumento desta cirurgia, esta apresenta ainda falhas como já dito anteriormente, como a pseudoartrose (fusão mal-sucedida) (Boden, 2002; Lewis *et al.*, 2016). Uma das principais razões para esta regeneração imperfeita é a formação de tecido mole no local da fusão, em vez da formação de tecido ósseo, sendo a escolha do material influenciadora na formação deste tecido no local, visto abranger o local afetado (Costa *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). Os enxertos ósseos são materiais que fornecem uma matriz artificial para o crescimento de tecido ósseo e são vastamente usados neste tipo de cirurgia (Russo *et al.*, 2014).

2.2. Engenharia de tecidos ósseos (ETO)

Mais de 800000 cirurgias são realizadas com uso a enxertos anualmente para reconstrução ou substituição de tecido ósseo. A cirurgia de reconstrução deste tecido baseia-se no princípio de substituir tecidos lesados por alternativas viáveis e funcionais (Laurencin *et al.*, 1999). Os autoenxertos são porções de tecido retirados do próprio paciente. São dos materiais mais famosos neste tipo de cirurgia devido à sua elevada imunocompatibilidade. Todavia, são limitados pela recolha de tecido do próprio paciente, e para além disto, possuem risco de infeções ou dor no local doador e imprevisibilidade de reabsorção óssea (Ikada, 2006; Wongwitwichot *et al.*, 2014). Os aloenxertos, são outro tipo de enxertos (tecido retirado de outos pacientes), usados em 34% destas cirurgias (Yunus Basha *et al.*, 2015), combatem os problemas anteriores, mas apresentam baixas propriedades osteoindutoras e riscos de transmissão de doenças (Ikada, 2006; Wongwitwichot *et al.*, 2014).

Com o avanço tecnológico, a engenharia de tecidos foi emergindo e trazendo novas perspectivas para solucionar problemas na reconstrução de tecidos/órgãos defeituosos ou lesados (por doença ou trauma). Surgiram assim, os materiais artificiais, como as membranas, para que pudessem substituir os enxertos, visto estes últimos possuírem várias desvantagens intrínsecas. Em comparação, estes materiais artificiais diminuem o risco de transmissão de doenças, apresentam maiores propriedades mecânicas e podem ser fabricados com mais de um tipo de material (Bròdano *et al.*, 2014). Os materiais substitutos de enxerto ósseo devem ser selecionados e usados com base nas suas propriedades funcionais de extensão ou substituto verdadeiro. Quando são usados em extensão, permitem o uso de menos enxerto ósseo. Os substitutos ósseos são definidos como uma combinação de biomateriais sintéticos, inorgânicos ou biologicamente orgânicos que podem ser inseridos no tratamento de osso lesionado, em vez de autoenxertos ou aloenxertos (Schlickewei & Schlickewei, 2007). Na Tabela 2.2 estão sistematizadas as vantagens e desvantagens destes três tipos de enxertos para a regeneração óssea.

Numa tentativa de melhorar esta cirurgia de modo a prevenir adesões pós-operatórias, vários tratamentos farmacológicos e barreiras têm sido estudadas e desenvolvidas recentemente, com o objetivo de privar o local de suposta regeneração de tecidos não ósseos (Chang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018). Uma das soluções propostas é o uso de membranas artificiais como materiais implantáveis no local lesionado, a fim de substituir os enxertos ósseos. O mercado para implantes na coluna em 2014 foi estimado em 8\$ bilhões e é de

esperar que aumente este ano, 2020, para 16 \$ (Duy & Anderson, 2018²). As membranas são objeto de estudo deste trabalho. Estas são formuladas a fim de atuarem como barreira físico-biológica prevenindo a formação de tecidos moles e promovendo a regeneração. As membranas são posicionadas entre o tecido mole e ósseo, atuando como barreira que impede a migração celular de tecidos epiteliais e conjuntivos, fornecendo assim um espaço vital para que as células ósseas possam multiplicar-se e preencher essa região (Costa *et al.*, 2016).

Tabela 2.2 Comparação entre os autoenxertos, aloenxertos e membranas com biocerâmicos em implantes de regeneração de tecido osso (adaptada de Spivak & Hasharoni, 2001; Bròdano *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015).

Tipo de Enxerto para reparação Ossea	Vantagens	Desvantagens
Autoenxertos	Osteocondutor; Osteogénico; Osteoindutor; Não transmite doenças.	Risco de dor crónica no local doador; Hematomas; Disponibilidade limitada; Infeções; Maior tempo operatório; Maior custo; Pseudoartrose.
Aloenxertos	Evita preocupações de morbilidade no local; Evita a remoção de osso saudáveis; Facilmente recolhidos.	Risco de infeção e transmissão de doenças; Fracas propriedades osteoindutoras e osteocondutoras; Resistência mecânica reduzida; Comparativamente com os autoenxertos, a sua integração ao osso nativo é mais lenta.
Membranas baseadas em Biocerâmicos	Design em várias formas e tamanhos; Biodegradável; Facilmente esterilizável; Não-tóxico; Não-imunológico; Disponibilidade ilimitada; Osteoindutor; Combinação com outros materiais.	Quebradiças; Pouca resistência ao cisalhamento ou fratura; Não é osteogénico.

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa surgiram há três décadas como um novo campo na área da biomedicina, e têm trazido abordagens proeminentes para a regeneração e cicatrização de tecidos danificados (Pina *et al.*, 2019). A medicina regenerativa é o termo geral para a diversidade de técnicas terapêuticas de restauração de órgãos/tecidos danificados ou afetados devido a acidentes ou doenças, servindo-se da capacidade regenerativa destas entidades biológicas (Kikuchi & Kanama, 2007). A medicina regenerativa tem duas vertentes como esquematizado na Figura 2.7: uma delas consiste na regeneração de células/tecidos por meio de reposição de tecidos (por exemplo, transplante de medula óssea); a outra consiste em usar técnicas de engenharia de tecidos para regenerar tecidos

² <https://www.idetchex.com/en.research-report-tissue-engineering-2018-2028-technologies-market-forecasts/565> (visto a 28.01.2020)

(Kikuchi & Kanama, 2007). Esta última área é a mais explorada no campo da medicina regenerativa (Florea & Andronescu, 2019).

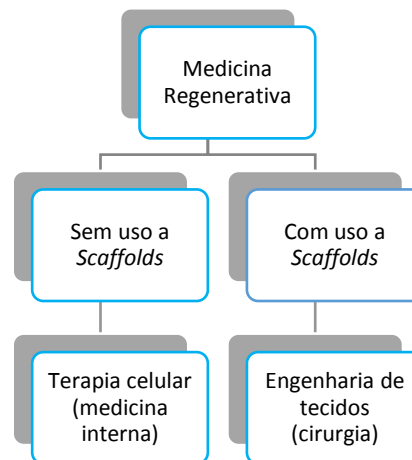


Figura 2.7 Medicina Regenerativa baseada no uso de *scaffolds* (adaptada de Ikada, 2006).

O termo engenharia de tecidos foi usado pela primeira vez em 1987 (Florea & Andronescu, 2019), tendo por definição uma área interdisciplinar, servindo-se de conhecimentos de biologia, química, ciência dos materiais, engenharia, medicina e de muitos outros campos para desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar e manter a sua função normal (Eltom *et al.*, 2019; Qu, 2019). Esta compreende três elementos essenciais: as células, membranas (*scaffolds*) e fatores de crescimento como apresentados na Figura 2.8. Porém estes nem sempre são usados simultaneamente (Ikada, 2006).

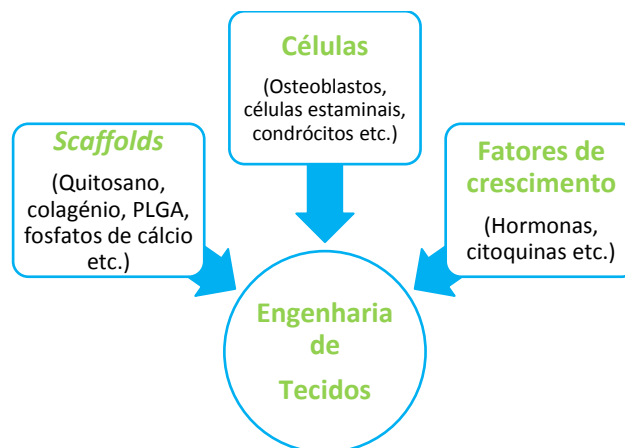


Figura 2.8 Componentes da área de engenharia de tecidos.

A engenharia de tecidos óssea (ETO) tornou-se uma área com bastante fama. Um dos fatores responsável é o aumento da população idosa, que está associada a vários problemas com os ossos, trazendo várias preocupações aos médicos, contudo o custo associado a estes tratamentos é bastante dispendioso. Perdas de tecido devido a ferimentos ou doenças, diminui o bem-estar na qualidade de vida de um paciente, por isso cada vez há mais interesse

em desenvolver terapias que envolvam a regeneração do osso, visto este ter um potencial regenerador, de modo a trazer esperanças para indivíduos que possam sofrer de problemas associados aos ossos (Rose & Oreffo, 2002).

A ETO tem promovido alternativas para construções “vivas” que têm o potencial de suportar uma regeneração *in situ* do tecido ósseo. O material que visa fornecer este potencial denomina-se de *scaffold*, *template*, membrana ou matriz extracelular artificial, possuindo semelhanças à matriz extracelular nativa, podendo assistir à proliferação, diferenciação e biossíntese de células. Para além disto, uma membrana para uso regenerativo deve também impedir migração de células indesejáveis no local de ação (Qu, 2019; Laurencin *et al.*, 1999; Ikada, 2006). As membranas fornecem uma estrutura deste tipo, que subentendem uma metodologia para a regeneração óssea, particularmente em casos de defeitos ósseos, fraturas ósseas ou desenvolvimento anormal de osso. Estas cobrem a área afetada de forma a promover o crescimento de tecido ósseo, impedindo o crescimento de tecido mole na mesma (Dimitriou *et al.*, 2012; Cheng & Yang, 2019) A idealização deste processo está representado na Figura 2.9.

As membranas são agrupadas em dois conjuntos, em reabsorvíveis e não-reabsorvíveis (Costa *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2013; Florjanski *et al.*, 2019):

- **Não-Reabsorvíveis:** mantêm a sua integridade estrutural durante o seu tempo de implantação, podendo ser deixadas durante longos períodos. No entanto, possuem a necessidade de uma segunda cirurgia para a sua remoção.
- **Reabsorvíveis:** aliviam o paciente do custo e desconforto de uma segunda cirurgia para removê-la. São produzidas a partir de materiais poliméricos naturais ou sintéticos. Contudo, têm a desvantagem de ter uma reabsorção não previsível e taxa de degradação também, afetando consequentemente a formação do novo osso.

Quando as membranas são delineadas têm de obedecer a certos requisitos para que desempenhem o seu papel fundamental (Costa *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2019):

- i) Considerar o período que dura a regeneração óssea a finalizar-se, visto esta não ter a mesma duração de tempo em todo o corpo. Por consequência, a escolha dos materiais da membrana é crucial e dependente desta duração;
- ii) Alguns dos ossos estão mais bem vascularizados que outros, por isso a membrana deve adequar-se à porosidade e permeabilidade do local. É de esperar que a membrana seja permeável para permitir a troca de nutrientes e oxigénio. A fim de possibilitar o acesso a células osteogénicas é necessário um material poroso. O tamanho dos poros é um fator importante para evitar a penetração excessiva de tecido mole no defeito, mas sim permitir a neovascularização e a formação óssea. É de salientar que não há um valor certo para o tamanho destes, mas um aumento destes leva a uma redução nas propriedades mecânicas do material. Deve também possuir topografia e superfície química apropriada também para permitir o anexo, diferenciação e proliferação de células, mimetizando o seu nicho celular.
- iii) Possuir propriedades bioativas para promover a regeneração óssea;

- iv) Acessível moldagem para se ajustar ao defeito e região anatômica;
- v) Ser biocompatível e não gerar respostas inflamatórias, devendo também resistir a invasões bacterianas;
- vi) Nos materiais reabsorvíveis, a sua taxa de degradação deve ser compatível à taxa de formação do novo tecido ósseo;
- vii) O material membranoso deve possuir propriedades mecânicas semelhantes ao osso, o que significa que este necessita de ter força suficientemente forte a fim de assegurar o isolamento do espaço a ser regenerado

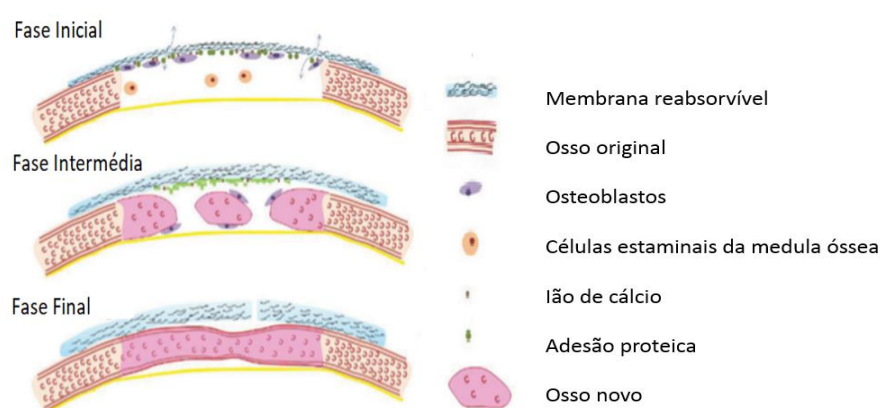


Figura 2.9 A membrana absorve íões de cálcio, proteínas e osteoblastos, de forma a promover formação óssea e deposição óssea. Numa fase inicial há mineralização e formação de apatite, até se formar uma estrutura óssea lamelar na área defeituosa (adaptada de Lu *et al.*, 2016).

A fabricação deste tipo de materiais depende do tipo de tecido que necessita de reparação, sendo que o tecido duro (osso) necessita de mais força para suportar as cargas a que está sujeito do que outro tipo de tecido (Lu & Eter, 2017). Os biomateriais mais favoráveis para reconstrução de tecido osso são as membranas baseadas em compósitos de cerâmico-polímeros (Yunus Basha *et al.*, 2015). As membranas para engenharia de tecidos ósseos devem obedecer a pré-requisitos como numerado anteriormente. Estas construções 3D baseiam-se numa interconetividade porosa que fornece uma difusão correta de oxigénio e nutrientes para assegurar a sobrevivência das células, de modo a permitir o crescimento, migração e proliferação celular. A alta porosidade permite a infiltração celular e colonização de matriz extracelular, sendo afetadas pelo tamanho do poro (Dorozhkin, 2010; Davison *et al.*, 2014). Poros interconectados de 100 µm de diâmetro é o requisito mínimo em membranas (Wongwitwichot *et al.*, 2014). Na Tabela 2.3 está exposta a relação dos diferentes tamanhos de poros e a sua função ou efeito biológico.

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANO PARA APLICAÇÃO NA REGIÃO LOMBAR

Tabela 2.3 Tamanho dos poros em membranas 3D com associação ao seu efeito e função em aplicações biomédicas (adaptada de Dorozhkin, 2010; Gomez *et al.*, 2018).

Tamanho do poro (Estruturas 3D)	Efeito Biomecânico e função
< 1 μm	Interações com proteínas; Responsáveis pela bioatividade;
1 – 20 μm	Desenvolvimento celular; Orientação para crescimento celular;
10 – 75 μm	Penetração de tecido fibroso;
75 – 100 μm	Crescimento de osteoide não mineralizada;
100 – 1000 μm	Crescimento celular; Crescimento e regeneração de tecido ósseo; Função mecânica;
>1000 μm	Funcionamento do implante; Tamanho/forma/estética do implante.

A biocompatibilidade, taxa de degradação, custo-benefício são fatores cruciais na escolha do implante na prática clínica. A osteoindução e osteocondução são os parâmetros que definem a engenharia de tecidos óssea, uma vez induzirem a adesão celular e diferenciação numa direção específica para formação de uma nova matriz óssea (Davison *et al.*, 2014). A habilidade osteoindutora induz células osteoprogenitoras a diferenciarem-se em linhas osteoblásticas, enquanto que a osteocondução possibilita o crescimento do osso na superfície do material implantado. As duas juntas suportam a adesão e proliferação celular (Jeong *et al.*, 2019). O tamanho e forma são fatores importantes na degradação *in vivo* do implante. Consequentemente, é necessário antes da implantação de qualquer material que haja estudos destas características. Também é de realçar que a degradação *in vivo* é mais rápida que a degradação *in vitro* (Davison *et al.*, 2014).

2.2.1. Biomateriais para reparação de tecido ósseo

O uso de materiais no ser vivo já remonta há milhares de anos. Os primeiros povos a usar substitutos artificiais para reparação de tecidos foram os chineses em 659 A.C. Os materiais permitiram ao Homem primitivo ajudar a desenvolver-se e chegar ao Homem moderno.

Os biomateriais são os componentes básicos das membranas, compreendendo o papel mais importante nas aplicações de engenharia de tecidos. A sua utilização abrange

tratamentos, reparações e substituições de tecidos ou órgãos no corpo (Qu, 2019). O uso da palavra “biomaterial” surgiu em 1960, o seu conceito desde logo levantou muita confusão e polémica na comunidade científica, tendo sido várias vezes modificado ao longo dos anos devido aos avanços rápidos da tecnologia e novas descobertas. Em 1987, na Conferência da Sociedade Europeia dos Materiais, chegou-se à definição minimalista que biomaterial era “um material não viável usado em aparelhos médicos, pretendido para interações com sistemas biológicos”. Com o passar dos anos, em 1999, voltou-se a debater o assunto, redigindo o termo para “material pretendido para interface com sistemas biológicos de modo a avaliar, tratar ou substituir algum tecido, órgão ou função do corpo”. Até se chegar ao consenso desta palavra foi preciso entender os conceitos subentendidos nela, como “bio” e “material”, e redefini-los com a evolução dos materiais e tecnologias biomédicas (Williams, 2009). A diferença entre este e material, é que o primeiro detém a habilidade de manter-se num ambiente biológico sem danificar o local envolvente, mas sim danificar-se durante a sua execução. Também se deve diferenciar biomaterial de materiais biológicos, visto os biomateriais serem os materiais aceites por tecidos vivos, ou seja, são aqueles que são usados em substituição dos mesmos; estes não são produzidos pelos organismos vivos, mas aparentam a mesma estrutura, composição e propriedades semelhantes aos materiais biológicos (Dorozhkin, 2010). Consequentemente, chegou-se então à mais recente e complexa definição de biomaterial pelo cientista David Williams: “substância projetada a assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para dirigir, pelo controlo de interações com componentes de sistemas vivos, o decurso de qualquer tratamento terapêutico ou diagnóstico (Williams, 2009). Existe uma vasta variedade de biomateriais usados em reparação ou substituição óssea. Estes materiais incluem os metais, as cerâmicas, os polímeros (naturais ou sintéticos) e as suas combinações (lu & Eter, 2017).

Os biomateriais apareceram assim pela primeira vez em 1960, a primeira geração é categorizada como bioinerte, interagindo minimamente com os tecidos à volta e tendo limitada, reabsorção, uma vez necessitarem de serem removidos cirurgicamente. Incluem materiais como metais (ligas de titânio) e cerâmicos (alumínia e zircónia), são usados em ortopedia e odontologia devido à sua alta resistência à corrosão e suporte de cargas elevada. No entanto, a incompatibilidade da rigidez destes com o osso e a sua fraca degradação, fizeram com que se desenvolvesse novos materiais (Qu, 2019; Elgali *et al.*, 2017).

Na segunda geração, aproveitaram-se as vantagens da natureza e foram isolados materiais naturais, que apresentassem características bioativas, podendo degradar-se *in vivo*. Neste grupo incluem-se os polímeros naturais (colagénio, quitosano, alginato) e os polímeros sintéticos. Os polímeros apresentam boa flexibilidade, gerando produtos de degradação não tóxicos e devido à sua composição podem ser moldados a necessidades específicas. Os polímeros naturais possuem a vantagem de serem facilmente reconhecidos pelo sistema biológico, levando a uma boa adesão celular, ao contrário dos sintéticos. No entanto, estes últimos podem ser moldados a uma taxa de degradação mais controlável. A terceira geração emergiu da necessidade de produzir biomateriais mais específicos e com características melhoradas, características estas morfológicas, mecânicas e biológicas que fossem capazes de fabricar biomateriais adequados a respostas biológicas específicas. Por exemplo, combinaram-se a força, rigidez e bioatividade dos cerâmicos com a flexibilidade e a reabsorbilidade dos polímeros, a fim de produzir um material ideal para a regeneração de tecido ósseo (Allo *et al.*, 2012; Yunus Basha *et al.*, 2015; Elgali *et al.*, 2017; lu & Eter, 2017; Qu, 2019). A junção destes materiais concebe assim um novo biomaterial, denominando-se biomaterial compósito, que surge da combinação de dois ou mais materiais de categorias distintas. O principal objetivo do compósito é melhorar as propriedades mecânicas e bioatividade das membranas (Qu, 2019).

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANO PARA APLICAÇÃO NA REGIÃO LOMBAR

A quarta geração, ainda em estudo, introduziu aos biomateriais compósitos já descritos fatores de crescimento e células osteogénicas (Allo *et al.*, 2012). Na Figura 2.10 observa-se a evolução da introdução das materiais ao longo dos anos e na Tabela 2.4 pode-se averiguar as vantagens e desvantagens inerentes destes.

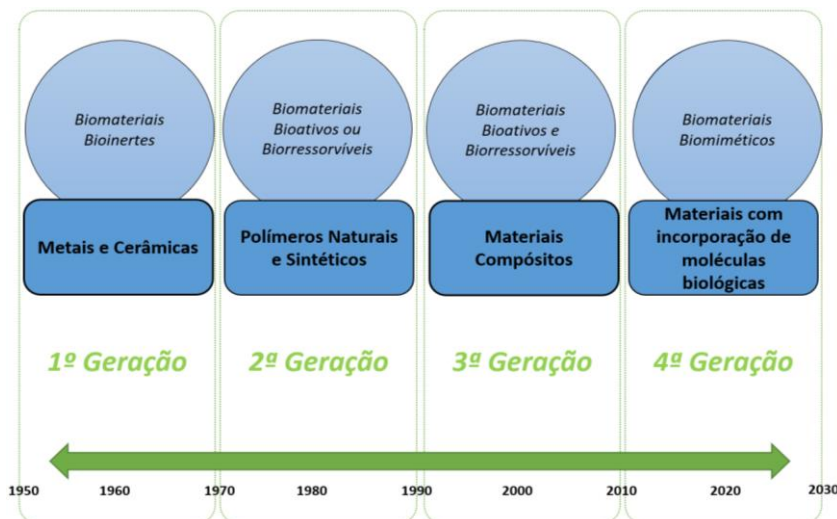


Figura 2.10 Evolução dos biomateriais em ETO (adaptada de Allo *et al.*, 2012).

Tabela 2.4 Comparação dos vários tipos de biomateriais usados em aplicações biomédicas, em membranas para engenharia de tecidos ósseo (adaptada de Elgali *et al.*, 2017; Qu, 2019).

Tipo de Biomaterial	Vantagens	Desvantagens
Polímeros Sintéticos	Inerte; Estabilidade em meio biológico; Propriedades físicas e mecânicas controláveis; Elasticidade;	Não-reabsorvível; Possibilidade de reações adversas em tecidos;
Polímeros Naturais	Bioabsorvível; Baixa imunogenicidade; Incorporação de componentes biológicos; Semelhança com a matriz extracelular; Taxas de degradação específicas; Boas propriedades biológicas; Versatilidade; Baixo custo; Fabricação e processabilidade; Elasticidade;	Baixas propriedades mecânicas; Durabilidade;
Metais	Plasticidade; Alta força de tensão; Alta resistência ao desgaste;	Não-reabsorvível; Baixa biocompatibilidade; Alta densidade;
Cerâmicos	Bioabsorvível; Osteocondutividade; Resistência à corrosão; Resistência à compressão;	Plasticidade; Baixa força de tensão; Alta densidade;

2.2.2. De Membrana a implante médico

O implante em estudo baseia-se num biocompósito constituído por polímeros naturais e cerâmicos bioativos. Os polímeros são usados devido à sua elevada compatibilidade, não gerando reações a corpo estranho e propriedades imunológicas. São reconhecidos biologicamente, favorecendo a adesão de células. A sua degradação é a sua principal desvantagem, pois não é controlável. Apresentam também propriedades mecânicas baixas, fraquejando em estruturas 3D, não possibilitando um sucesso linear no suporte e proteção de osteoblastos nas aplicações em causa. No entanto, pode-se reforçar com a adição de cerâmicos bioativos. Visto a matriz óssea ser composta por cerâmicos e polímeros não é de estranhar que muitos destes materiais sejam combinados em membranas (Allo *et al.*, 2012), por isso cada vez mais estão a ser explorados materiais compósitos baseados nestes dois grupos para engenharia de tecidos óssea. A pesquisa atual mostra resultados promissores, havendo mais estudos para preparação de biomateriais poliméricos em implantação médica (Davison *et al.*, 2014). A previsão do mercado de produtos para engenharia de tecidos de 2018 a 2028, é de que ultrapasse o valor de US \$ 4,8 biliões. Estes produtos visam contribuir para a redução de custos médicos para o paciente (Kikuchi & Kanama, 2007).

Embora os resultados para criar alternativas aos enxertos convencionais seja prometedora, do ponto de vista mecânico e biológico, são necessários estudos a longo prazo a fim de garantir interações tecido-implante, e finalmente, transformá-los numa estratégia clinicamente viável. A viabilidade destes estudos antes de atuarem no mercado requerem uma investigação pré-clínica. Testes *in vitro* e *in vivo* necessitam de ser realizados nas membranas, para averiguar a atividade celular, toxicidade, imunogenicidade do material, doses e libertações de fármacos. Por consequente, várias investigações são realizadas de modo a criar produtos conforme o exigido pelos órgãos reguladores de aprovação, antes da aplicação em pacientes humanos (Pina *et al.*, 2019). Animais de pequeno porte, como coelhos ou ratos, são utilizados fortemente em testes *in vivo* em ETO, pois apresentam um período mais curto de observação, maior disponibilidade e custos de manutenção relativamente baixos (Roseti *et al.*, 2017). A função do implante médico está subjacente à sua biocompatibilidade, categoria da cirurgia e características do paciente. De acordo com o *Standard Practice for Assessment of Cytotoxicity of Materials from the Chinese National Standards* (GB/T 16886.5-2003), se a citotoxicidade do material for acima de 80%, este apresenta o requisito principal de citotoxicidade para se categorizar uma biomaterial médico (Bi *et al.*, 2019).

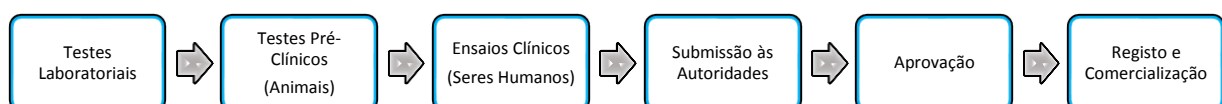


Figura 2.11 Várias etapas de um dispositivo médico até à sua comercialização no mercado.



As membranas após tais análises com sucesso, só podem ser autorizados como dispositivos biomédicos pelos corpos governamentais (como a *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América. Na Europa existe uma autoridade projetada por cada



DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANO
PARA APLICAÇÃO NA REGIÃO LOMBAR

estado membro; em Portugal a autoridade denomina-se INFARMED. O processo de autorização destes dispositivos biomédicos é caro e demorado, envolvendo várias etapas de pesquisa e desenvolvimento antes de chegar à aprovação final como exibido na Figura 2.11. A regulamentação de dispositivos médicos é variável em todo o mundo, no entanto existem iniciativas atuais que trabalham, a fim de produzir um único conjunto de documentos que compreendam os requisitos de todas as autoridades reguladoras envolvidas (Roseti *et al.*, 2017).

Na Tabela 2.5 estão expostos alguns dos produtos comerciais disponíveis no mercado usados na fusão posterolateral como enxertos ósseos artificiais. Estes produtos como evidente tiveram de passar pelas várias etapas, representadas anteriormente, até serem comercializados.

Tabela 2.5 Tabela de produtos comercialmente disponíveis como substitutos de enxerto ósseo.

Produto	Constituintes	Observações
<p style="text-align: center;">NanOss®</p>  <p>https://www.medicalexpo.com/pt/prod/rti-surgical/product-103597-820811.html</p>	<p><i>Bioscaffold</i> composto por cristais de nanohidroxiapatite e um transportador de colágeno aberto e estruturado.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cristais de nanohidroxiapatite têm uma conformação (15-100 nm) semelhante aos cristais do osso humano (25-500 nm) e composição; facilita a infiltração de células e a osteocondução, permitindo uma melhor fusão; formação de um <i>scaffold</i> que otimiza a mineralização e remodelação óssea (Epstein, 2015); • Não há risco de transmissão de doenças. • Idêntica atividade osteoclástica e osteoblástica ao osso normal, reduzindo a pseudoartrose, infeções e aumento no crescimento de novo osso (Macmillan <i>et al.</i>, 2014). • Num estudo em 45 pessoas, o biocompósito apresentou uma taxa de fusão de 100%, sem pseudoartrose e infeções (Epstein, 2015).
<p style="text-align: center;">Vitoss synthetic (stryker)®</p> 	<p><i>Scaffold</i> com β-fosfato tricálcico</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfato de cálcio altamente poroso (até 90% poroso) que é estável a pH fisiológico e é reabsorvido durante o processo natural de remodelação óssea; • Nanopartículas com diâmetro de 100 nm que aumentam a taxa de fusão óssea, ajudando na reabsorção e formação óssea (Epstein, 2015); • Não há risco de transmissão de doenças. • Enxerto ósseo sintético com uma estrutura ultra-porosa interconectada que se assemelha a osso esponjoso

<p>https://www.stryker.com/us/en/spine/products/vitoss.html</p>		<p>(Epstein, 2015; Bow <i>et al.</i>, 2019);</p> <ul style="list-style-type: none"> • Numa análise com Vitoss como enxerto, 210 pessoas de 213 apresentou 98.6% de fusão óssea enquanto que as restantes apresentaram 1.4% de pseudoartrose e 0.94% infeções de cicatrização (Epstein, 2015).
<p>Activefuse (Baxter)®</p>  <p>https://globaladvancedsurgery.baxter.com/products/actifuse</p>	<p>Produto com silicatos e com fosfatos de cálcio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Destinado apenas a aplicações ortopédicas como preenchimento de lacunas e vazios que não são intrínsecos à estabilidade da estrutura óssea. • Não há risco de transmissão de doenças. • Osteocondutor, osteostimulador e acelera a formação óssea.
<p>ChronOS®</p>  <p>https://www.injmedicaldevices.com/en-US/product/chronos-bone-graft-substitute-trauma</p>	<p>Produto com β-fosfato tricálcico sintético.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Preenchimento por cavidades ósseas (Bow <i>et al.</i>, 2019); • Durante o processo de cicatrização, é reabsorvido e substituído por osso entre 6-18 meses. • Estrutura com estabilidade mecânica com poros distribuídos dentro de uma faixa de 100 a 500 μm, o que fornece o suporte para vascularização e migração de osteoclastos e osteoblastos; • Pode ser usado sozinho ou misturado com autoenxerto para defeitos grandes; • Não há risco de transmissão de doenças.

2.2.3. Polímeros Naturais

Dentro dos polímeros naturais, os polissacarídeos são o grupo mais abundante de biopolímeros, desempenhando papéis cruciais em muitos sistemas biológicos como em comunicações celulares, no desenvolvimento embrionário, infeções de bactérias ou vírus e na imunidade celular e humoral. São usados extensamente na indústria alimentar, farmacêutica e têm emergindo cada vez mais em aplicações biomédicas (Liu *et al.*, 2015).

Estes polissacarídeos são macromoléculas formadas pela união de muitos monossacarídeos. Classificam-se de várias maneiras, pela estrutura básica, composição

química, solubilidade ou aplicações. Pela sua composição química podem ser agrupados de duas formas, em homopolissacarídeos/ homoglicanos, que são constituídos por um tipo de monómero, ou heteropolissacarídeos/heteroglicanos, que são constituídos por mais de um tipo de monómero (Liu *et al.*, 2015). As estruturas destes é caracterizada pelas suas ligações glicosídicas aos anéis de açúcar e grupos laterais. Estas ligações são facilmente degradáveis por enzimas, enquanto os grupos laterais afetam diretamente a densidade de carga do polímero, a hidratação e a reatividade química, sendo também responsáveis pela formação de estruturas secundárias. Existem dois grupos principais de polissacarídeos: celulose e todos os derivados de células vegetais (alginatos) ou de origem animal (quitina das conchas de camarão e outros crustáceos do mar) (Guarino *et al.*, 2015).

Polissacarídeos como alginato, quitina, quitosano, celulose e ácido hialurónico têm sido desenvolvidos como biomateriais para aplicações em engenharia de tecidos. O emprego destes em membranas tem trazido bastante atração devido às suas particularidades, como a biodegradação, biocompatibilidade, não-toxicidade, sendo estes uns dos requisitos das membranas em ET (Liu *et al.*, 2015).

2.2.3.1. Polissacarídeo: Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo linear, semicristalino, com alto peso molecular de origem catiónica (Di Martino *et al.*, 2005). É um derivado da quitina, que foi descoberta a 1811 (Sharma *et al.*, 2016; Gedam *et al.*, 2018), de origem natural, encontrada no exoesqueleto de crustáceos marinhos (Venkatesan & Kim, 2014). A quitina e o quitosano apresentam grande interesse comercial por exibirem características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-toxicidade e habilidade de absorção (Gedam *et al.*, 2018). O quitosano é o segundo polímero natural mais abundante encontrado na natureza, após a celulose, que é caracterizado pelo seu grau de desacetilação e massa molecular (Hussain *et al.*, 2014).

A quitina e o quitosano são polissacarídeos nitrogenados que consistem em unidades de β -(1-4)-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina. Estes contêm diferentes quantidades de grupos N-acetil, dependendo da sua origem e método de isolamento (Yang *et al.*, 2005; Alvarenga *et al.*, 2010). O quitosano forma-se a partir da desacetilação da quitina como demonstrado pela Figura 2.12 (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015; Ahmed & Ikram, 2016; Gedam *et al.*, 2018). O grau de desacetilação (GD) representa o número de grupos amina livres na cadeia (Hussain *et al.*, 2014), onde os grupos amina (NH_2) criados foram substituídos pela eliminação do grupo acetil. Um grau de desacetilação (60 ou 70%) da quitina, já se denomina como quitosano (Di Martino *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2014; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015). Os grupos amina e hidroxil do quitosano fornecem funcionalidade, tornando-o um polissacarídeo muito reativo, nomeadamente as suas cargas positivas, interagem eletrostaticamente com cargas negativas de outras moléculas. Este GD é um parâmetro que influencia as propriedades mecânicas, biológicas e químicas do polímero de quitosano (especialmente nos seus grupos funcionais amina e hidroxil (OH)). O quitosano atua como base fraca, tendo um pK_a que varia entre 6.3-7.2, que é influenciado também pelo GD e densidade de carga. Este valor de pK_a tende a diminuir com o aumento do GD, contudo outros processos, como a reticulação, podem modificar o valor desta constante de acidez (Yuan *et al.*, 2011; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015).

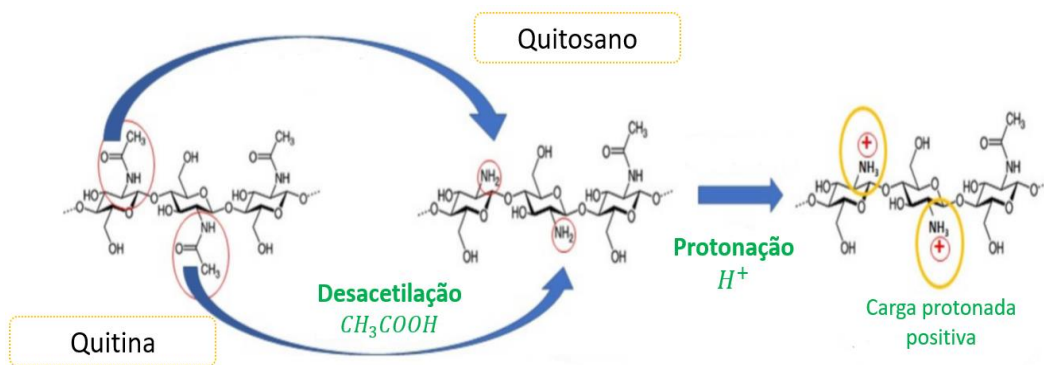


Figura 2.12 Estrutura química da quitina e do quitosano, em que há formação do quitosano, a partir da reação química de desacetilação. Protonação do quitosano em ambiente ácido.

A solubilidade, pH, biodegradabilidade e absorção dependem da quantidade de grupos amina livres na cadeia (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015). Em soluções ácidas ($\text{pH} \leq 6$), os grupos amina livres tornam-se protonados (NH_3^+) como é visível na Figura 2.13, conferindo um comportamento policatiónico a este polímero e torna-o solúvel. A pH mais alto ($\text{pH} > 6.5$) os grupos aminas encontram-se desprotonados, e o quitosano torna-se insolúvel, podendo precipitar e formar hidrogéis. Posto isto, o quitosano é então insolúvel em água, bases, solventes orgânicos e é solúvel em ácidos, e é especialmente usado com o ácido acético (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015; Ahmed & Ikram, 2016).

A massa molecular deste polissacarídeo é um fator que influencia as propriedades cristalinas, de degradação, mecânicas e de viscosidade. No fabrico de materiais, como membranas de quitosano, a viscosidade do material estará então dependente da sua massa molecular (maior massa molecular, maior viscosidade), podendo o material comportar-se como um material pseudoelástico. A massa molecular é inversamente proporcional à capacidade de *sweeling*. Estes parâmetros, massa molecular e GD, influenciam por sua vez a taxa de degradação do quitosano; quanto maior massa molecular e maior GD, mais lenta é a taxa de degradação em estudos *in vivo* e *in vitro* (Yuan *et al.*, 2011; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015).

Na Tabela 2.6 encontra-se sistematizado a influência do aumento deste fator nas características biológicas do quitosano.

Tabela 2.6 Influência nas características biológicas do quitosano aquando maior grau de desacetilação (adaptada de Hussain *et al.*, 2014; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015).

Adesão e Proliferação Celular	Efeito Antioxidante	Características Hemostáticas	Efeito Antimoral e Analgésico	Biodegradação
+	+	+	+	-

Biodegradação e Toxicidade: O GD como já dito influencia as propriedades do quitosano, o seu impacto recai nas características de degradação *in vitro* e *in vivo*. Um GD entre 84-90%, atrasa a taxa de degradação deste polímero, o que pode ser benéfico em aplicações em que o quitosano requer mais tempo de utilização, por exemplo meses (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015). Produtos baseados neste polissacarídeo estão subjacentes ao GD deste polissacarídeo. A lisozima é a enzima responsável pela degradação *in vivo* deste polissacarídeo, que hidrolisa a sua cadeia devido à suscetibilidade das ligações β (1-4). Porém, a degradação de implantes com quitosano ainda depende de vários fatores extra, como forma do implante, peso molecular, cristalinidade, conteúdo de água e química da superfície do quitosano (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015). Foram demonstrados em estudos com implantes, que filmes de quitosano com GD entre 69-74% induziram uma rápida degradação, com uma reação inflamatória aguda, com reabsorção completa do material após 4 semanas da implantação; enquanto que filmes com GD entre 74-90% resultaram numa inflamação menos aguda e numa degradação mais lenta (Peh *et al.*, 2000; Szymańska & Winnicka, 2015). A sua degradação enzimática não produz resíduos tóxicos, e esta não toxicidade deve-se ao facto deste polímero ser produzido por GlcN (unidade glucosamina) e GlcNAc, que são componentes naturais de tecidos dos mamíferos (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015).

Biocompatibilidade: A sua biocompatibilidade também é influenciada pelo GD, sendo que diferentes GD apresentam diferentes biocompatibilidades *in vivo* (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015). Podendo assim, afetar propriedades biológicas de cicatrização em tecidos, adesão celular, proliferação, osteogénese e degradação por enzimas. A adesão e proliferação celular aumenta com o aumento do GD, uma vez os grupos amina da cadeia do quitosano, aumentarem a capacidade de adsorção celular, havendo assim mais interações entre o quitosano e as células, tornando-o mais biocompatível (Gedam *et al.*, 2018). Porém estudos *in vitro* mostraram que a citocompatibilidade não é comprometida pelo GD (Chatelet *et al.*, 2001; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015). A sua natureza catiónica é responsável por interações eletrostáticas com os proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAGs) e outras moléculas carregadas negativamente, sendo que as citoquinas e fatores de crescimento ligam-se aos GAGs, por isso a incorporação de GAGs em *scaffolds* com base de quitosano têm demonstrado interesse na colonização de células (Madhally & Matthew, 1999; Di Martino *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2016).

Características hemostáticas e anti-microbiais: O papel de agente hemostático dá-se graças ao facto dos grupos amina protonados do esqueleto do quitosano interagirem eletrostaticamente com as várias proteínas e glicolípídeos carregados negativamente na superfície dos glóbulos vermelhos. Esta interação aumenta a viscosidade do sangue, ativando a adesão e agregação de plaquetas na parede vascular para a hemóstase fisiológica. Os coágulos sanguíneos são formados pela agregação intensiva de hemácias ao redor do local da ferida, de modo a parar rapidamente o sangramento (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). O quitosano inibe o crescimento de muitos tipos de fungos, leveduras e bactérias. Em soluções ácidas diluídas, as suas cargas positivas interagem com os resíduos de macromoléculas carregadas negativamente na superfície celular dos microrganismos, supostamente em competição com o Ca^{2+} nos locais eletronegativos na membrana destes, comprometendo a integridade desta, enfraquecendo-a. Os efeitos antimicrobianos têm trazido um significado especial ao quitosano porque tem sido comprovado que os agentes antimicrobianos geralmente levam à citotoxicidade, atrasando o processo de cicatrização, por isso o uso de quitosano em implantes ou curativos é cada vez mais comum (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2015).

As propriedades hemostáticas e antimicrobianas deste polissacarídeo explicadas anteriormente têm ganhado cada vez mais interesse na comunidade científica, sendo este polissacarídeo usado ultimamente em aplicações de reparação de tecidos. Com o desenvolvimento de estudos deste polímero ao longo dos anos, usados como biomateriais 3D na aplicação de reparação de tecido duro, foram ainda adicionados outros parâmetros que puderam aumentar o uso deste. O polissacarídeo assegura o crescimento e expressão fenotípica de osteoblastos (Venkatesan & Kim, 2014), tendo assim também características osteoindutoras e osteocondutoras, visto causar rápida regeneração óssea em estágios iniciais, tornando-o vantajoso para aplicação de engenharia de tecidos óssea (Chen *et al.*, 2006; Chaudhary & Garg, 2015; Sharma *et al.*, 2016; Gedam *et al.*, 2018). Outros testes revelaram um efeito organizador de tecido no processo de cicatrização do osso (Wang *et al.*, 2018). Também apresentam propriedades anti-inflamatórias (Cheng & Yang, 2019). Devido a estas particularidades, o quitosano tem demonstrado ser uma escolha preferencial ao longo dos anos em aplicações biomédicas como visível na Figura 2.13, nomeadamente na reparação de tecidos em implantes 3D biocompósitos e sistemas de libertação de fármacos (Chatelet *et al.*, 2001).

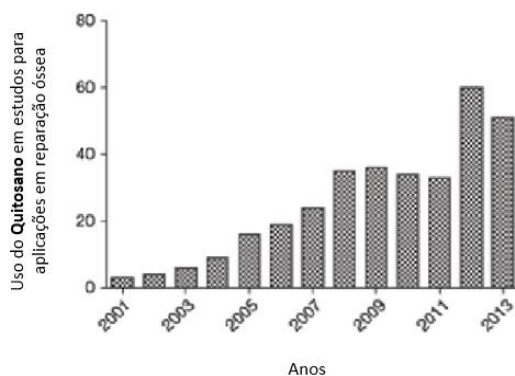


Figura 2.13 Gráfico da evolução do uso de quitosano ao longo dos anos em aplicações de reparação óssea (adaptada de Venkatesan & Kim, 2014).

O quitosano pode ser processado em diferentes formas como nanopartículas, hidrogéis, nanofibras, filmes e membranas para aplicações de engenharia de tecidos (Ahmed & Ikram, 2016). Apesar das inúmeras características deste biopolímero, pode-se apontar desvantagens como a baixa estabilidade química e física (devido à sua natureza hidrofílica), sensibilidade ao pH, solubilidade em ácidos orgânicos, não-porosidade e reduzida área de superfície específica. Podem-se realizar modificações, químicas ou físicas, de modo a obter características desejáveis numa aplicação específica com o quitosano (Gedam *et al.*, 2018). Para um aumento das propriedades mecânicas, o quitosano pode ser modificado com a junção de outros polímeros naturais como o alginato ou cerâmicas como a hidroxiapatite e o fosfato tricálcico (Sharma *et al.*, 2016). Uma das outras soluções propostas é o emprego de agentes reticulantes, influenciando as características do quitosano, como a massa molecular e grau de desacetilação, a fim de melhorar a elasticidade e resistência. Os agentes reticulantes são usados com pelo menos dois grupos funcionais reativos, para que possam fazer pontes entre as cadeiras do quitosano e os formaldeídos e dialdeídos (gloxal) (Meng *et al.*, 2010; Rodríguez-vázquez *et al.*, 2015; Ahmed & Ikram, 2016). No entanto, é importante realçar que estes agentes podem modificar a permeabilidade de membranas deste composto (Chen *et al.*, 2002).

A forma mais comum para produção de membranas de quitosano é por congelamento e liofilização da solução deste. Os espaços ocupados pelos cristais de gelo da solução são esvaziados durante a sublimação, deixando a estrutura tridimensional formada porosa (Venkatesan & Kim, 2014). Apesar das vantagens que este apresenta, este tipo de membrana apenas à base de quitosano apresenta limitações, incluindo a fraca estabilidade química e mecânica, alta sensibilidade ao pH, não apresentam porosidade significativa e solubilidade em meio ácido (Gedam *et al.*, 2018). Estas limitações podem trazer prejuízos na implantação desta membrana em meio biológico do tecido duro. Logo, surgiu a ideia de usar materiais complementares ao quitosano, que por sua vez tem sido uma mais valia para um melhoramento destas estruturas 3D. O alginato e os fosfatos de cálcio são exemplos de materiais que podem complementar as membranas de quitosano, sendo estes analisados neste trabalho.

2.2.3.2. Polissacarídeo: Alginato de Sódio

O alginato é outro polímero natural usado neste projeto de trabalho. É extraído de algas castanhas (*Phaeophyceae*), podendo também ser sintetizado por bactérias biossintéticas (*Azotobacter* e *Pseudomonas*), sendo as propriedades mecânicas e a estrutura química mais definidas neste último (Pereira *et al.*, 2013). É um polissacarídeo de origem aniônica, amorfo com características biocompatíveis, biodegradáveis, baixa toxicidade e baixo custo (Venkatesan *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2013). É geralmente usado como estabilizador, agente gelificante nas indústrias alimentares, têxtil, farmacêutica e biotecnológica (Guarino *et al.*, 2015).

Anualmente, a produção de alginato estima-se em 3800 toneladas a nível mundial, sendo a sua forma mais comum de comercialização o alginato de sódio. Porém existem outros tipos de alginato como o ácido alginico, cálcio e sais de potássio (Venkatesan *et al.*, 2014). O alginato é um copolímero composto por diferentes resíduos de ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico. Os monómeros que o compõem são distribuídos em três blocos distintos, resíduos manurônicos (M), resíduos gulurônicos (G) e resíduos alternados destes (GM) como demonstrado na Figura 2.14 (Venkatesan *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2019). Acredita-se que apenas os resíduos G de alginato participem na reticulação intermolecular com catiões divalentes (por exemplo, o Ca^{2+}) para produção de hidrogéis. O conteúdo de blocos M e G distribuídos ao longo da cadeia polimérica e o comprimento de cada bloco determinam as características físicas (rigidez), químicas e também as propriedades de gel deste polímero. Por sua vez, estas irão influenciar as suas características de biocompatibilidade (Venkatesan *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2013).

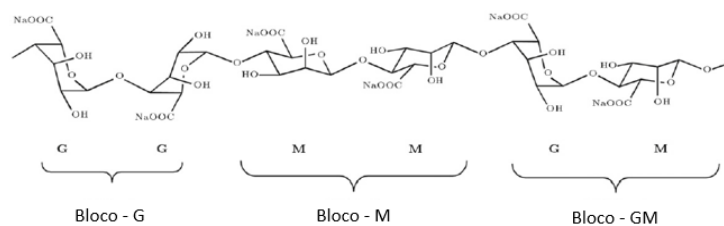


Figura 2.14 Estrutura química do alginato com os seus respetivos blocos (retirada de Daemi & Barikani, 2012).

A sua excelente biocompatibilidade e bioatividade deve-se à ação dos catiões divalentes imobilizarem as células. O alginato de sódio possui também propriedades antimicrobiais e antifúngais, que são precisas em aplicações de cicatrização de tecidos (Liu *et al.*, 2015). O alginato é um material que pode ser usado facilmente para produção de membranas, para tratamento de perda ou falha de órgãos, sendo extensivamente usado como base de biomateriais, em aplicações ortopédicas. Pode ser modificado em várias formas, como hidrogéis, microesferas, microcápsulas, esponjas e fibras. Os seus maiores campos de aplicações são em sistemas de libertação de fármacos/drogas e engenharia de tecidos (Venkatesan *et al.*, 2015). Desde 2000, o estudo deste polímero tem aumentado, nomeadamente como material em engenharia de tecidos do osso, observável na Figura 2.15 (a), e mais especificamente para reconstrução de osso artificial na Figura 2.15 (b).

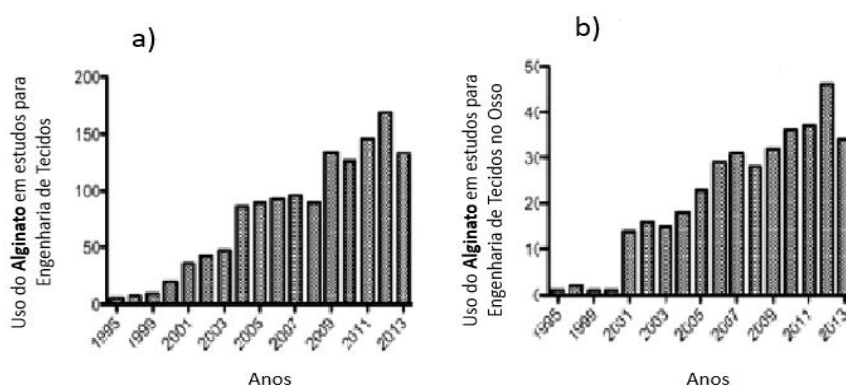


Figura 2.15 Gráfico da evolução ao longo dos anos de estudos publicados com o uso do polímero Alginato em (a) engenharia de tecidos e (b) especificamente em aplicações no tecido ósseo (adaptada de Venkatesan *et al.*, 2015).

Os formatos mais comuns de biomateriais baseados em alginato para aplicações biomédicas são as membranas e os hidrogéis, sendo os primeiros cada vez mais explorados devido à sua facilidade de regeneração de tecidos ou órgãos, incluindo o osso, pele, pâncreas e pulmões. Os métodos mais comuns para produção de membranas são por congelamento-liofilização e *electrospinning* (Venkatesan *et al.*, 2015). A composição, peso molecular, pureza e concentração desde polímero em membranas são parâmetros que influenciam na sua biocompatibilidade, adesão celular, proliferação, força mecânica e diferenciação osteogénica (Venkatesan *et al.*, 2015). O alginato na cicatrização de tecidos vivos mantém um microambiente hostil, minimizando as infeções bacterianas. No entanto, oferece propriedades de degradação, bioatividade e mecânicas relativamente baixas para uso de membranas em engenharia de tecidos (Venkatesan *et al.*, 2014).

O quitosano, apresenta baixa flexibilidade, raramente é usado sozinho, sendo frequentemente usado por modificação através de vários métodos, como reticulação ou mistura. É sabido que a mistura é um método eficaz e conveniente para melhorar o desempenho dos materiais poliméricos (Meng *et al.*, 2010). Dentro dos polissacarídeos naturais, o alginato e o quitosano são dos polímeros mais usados em conjunto para aplicações biomédicas (Venkatesan *et al.*, 2015; Baysal *et al.*, 2013). Ambos podem ser processados facilmente em solventes hidrofílicos, como a água (Baysal *et al.*, 2013).

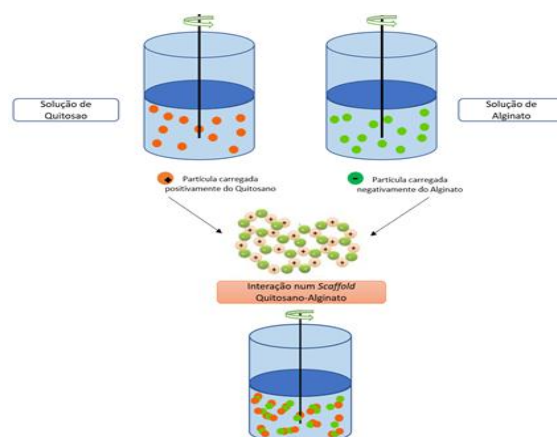


Figura 2.16 Interação química entre as partículas carregadas positivamente do quitosano e negativamente do alginato numa mistura.

O quitosano é o polissacarídeo catiónico mais abundante, sendo que a sua natureza permite a produção de complexos polieletrólitos com polissacarídeos aniônicos, como o alginato de sódio (Venkatesan *et al.*, 2015). O alginato e o quitosano são dos complexos polieletrólitos mais investigados, estes complexos podem ser definidos como materiais formados por meio de interações iônicas entre polieletrólitos com carga oposta (Gierszewska *et al.*, 2018). A formação deste complexo poliacação-polianião (polieletrólito) é impulsionada principalmente por um mecanismo eletrostático, baseada na forte interação de Coulomb entre polieletrólitos de carga oposta, que leva a uma agregação espontânea após a mistura das soluções componentes, sem necessidade de agentes iniciadores ou catalisadores (Meng *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2014). A formação deste complexo acontece na faixa de pH entre os valores dos pK_a s dos dois polímeros, onde mais de metade dos grupos iônicos encontram-se ionizados (Coimbra *et al.*, 2011). Para o sistema formado entre o quitosano e o alginato de sódio isto corresponde a valores de pH entre 6.2-6.5 (intervalo de pK_a do quitosano) e 3.38-3.65 (intervalo de pK_a dos M- e G-resíduos) (Meng *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2014)

Na Figura 2.16 é representada a interação destes dois materiais numa mistura. Comparando com compostos isolados, os complexos de polieletrólitos são materiais que apresentam maior estabilidade em meios de diferentes pH, resistência estrutural aprimorada e estabilidade mecânica (Gierszewska *et al.*, 2018). Este complexo é não-tóxico, biodegradável e hidrofílico, com baixo custo e grande acessibilidade. Em soluções ácidas, os grupos amina protonados (NH_3^+) do quitosano interagem com os grupos ionizados carboxil do alginato sódio, pertencentes aos monossacarídeos nos resíduos manurónicos (M) e resíduos gulurónicos (G). A estabilidade deste complexo depende fortemente do grau de ionização dos grupos carregados, que são influenciados pelo pH do meio (Costa *et al.*, 2018).

Meng *et al.* (2010), num estudo de membranas de AS/Q observaram que a densidade de carga de dois polieletrólitos carregados de maneira oposta, reduz muito, resultando em quantidades significativas de complexo polieletrólito (PEC) insolúvel, o que leva a uma maior viscosidade do material. Observaram também a formação de complexos de PEC com uma morfologia amorfa, que é explicado pelas fortes interações entre o polissacarídeo de quitosano catiónico e o grupo $-COO^-$ aniônico do alginato de sódio, sendo que membranas de PEC apresentaram maior grau de rugosidade de superfície em comparação com membranas de quitosano ou alginato isoladas. Os autores concluíram ainda que estas membranas podem ajudar na cicatrização de feridas.

Estes complexos podem ser preparados através de uma simples mistura, seguida de congelamento-liofilização para produção de membranas. Estas membranas de quitosano-alginato demonstram uma melhoria na força mecânica e proliferação celular, possuindo ainda uma porosidade uniforme diretamente proporcional à concentração de alginato no compósito (Venkatesan *et al.*, 2015). O alginato fornece grupos funcionais para a proliferação, enquanto o quitosano origina uma membrana com uma estrutura mais bem definida (Baysal *et al.*, 2013). A aplicação deste biocompósito em engenharia de tecidos óssea tem ganho cada vez mais interesse, visto que haver estudos que reportam melhoramentos na formação de osso, onde osteoblastos anexam-se mais rapidamente à membrana, proliferando-a e depositando matriz calcificada (Venkatesan & Kim, 2014). Para além disto, possuem alta estabilidade a variações de pH do meio (Xu *et al.*, 2016) e formam uma estrutura equilibrada (devido à interação iónica forte entre os grupos amina do quitosano e os grupos de carboxil do alginato) estimuladora de formação de novo osso e vascularização rápida (Sowjanya *et al.*, 2013). Este tipo de membrana apresenta ainda biodegradabilidade, biocompatibilidade, toxicidade nula e propriedades adequadas ao crescimento de células para formação e reconstrução óssea (Ölmez *et al.*, 2007). Na Tabela 2.7 é feito um resumo dos vários estudos realizados com estes polímeros em conjuntos em engenharia de tecidos.

Tabela 2.7 Observações de algumas propriedades do complexo quitosano/alginato de sódio (AQ) em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Aplicação (Quitosano/Alginato)	Observações	Modelo	Referência
Scaffold (hidrogel)	➤ Promoveu um ambiente favorável à adesão celular e crescimento celular.	<i>in vitro</i>	(Baysal <i>et al.</i> , 2013)
Scaffold (gel)	➤ Deposição de cálcio após a quarta semana de implantação no tecido ósseo.	<i>in vivo</i>	(Ölmez <i>et al.</i> , 2007)
Scaffold (membrana)	➤ Forneceu regulação no crescimento de tecido mole, sobre o tecido duro.	<i>in vitro</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
Scaffold (membrana)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ O alginato e quitosano demonstraram características biodegradáveis na implantação; ➤ Eficiente barreira anti-adesiva, na inibição de adesão a tecidos adjacentes. 	<i>in vivo</i>	(Chang <i>et al.</i> , 2012)

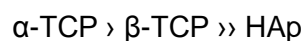
2.2.4. Biocerâmicos

Em engenharia de tecidos ossos, a comercialização de fabrico de membranas baseados em fosfatos de cálcio (CaP) é cada vez mais comum devido à sua similaridade com o osso (Sharma *et al.*, 2016; Florea & Andronescu, 2019). Estes são necessários aquando a necessidade de alívio de dor e restauração de funções do tecido osso doentes ou danificados (Dorozhkin, 2010). O primeiro artigo a referenciar o nome “biocerâmicos” foi publicado em 1971, passado uns anos, em 1988, surgiu o primeiro simpósio no Japão, em Kyoto, onde estes ganharam cada vez mais popularidade e adeptos no uso destes biomateriais em engenharia de tecidos (Dorozhkin, 2010).

São constituídos por catiões de cálcio e aniões de fósforo. Os iões de cálcio fazem parte dos constituintes do osso, que ajudam na regeneração óssea e regulam a formação/reabsorção de osteoclastos, enquanto que os iões fósforo regulam a diferenciação e crescimento de osteoclastos. Os fosfatos de cálcio são cerâmicos que apresentam boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e adesão em tecidos humanos. Para além disto, exibem capacidades osteoindutoras e osteocondutoras, ajudando na diferenciação osteogénica de células estaminais mesenquimais. Porém, para que demonstrem estas propriedades bioativas, é necessário a degradação dos seus iões. Isto é fulcral para se estimular a formação de minerais ósseos na sua superfície. A sua biocompatibilidade deve-se à habilidade destes serem dissolvidos pelos fluídos corporais (Jeong *et al.*, 2019). É de referenciar que fosfatos de cálcio com razão Ca/P <1 não são eficazes em aplicações biomédicas devido à sua elevada solubilidade, acidez e devido ao osso possuir uma razão Ca/P de 1,71 (Dorozhkin, 2010; Jeong *et al.*, 2019).

Os fosfatos de cálcio mais usados em práticas clínicas são a hidroxiapatite (HAp) e o fosfato tricálcico (TCP), podem ser sintetizados ou derivados de corais (Russo *et al.*, 2014). Estes dois são muito usados em extensão com enxertos ósseos ou mesmo como materiais substitutos, especialmente na fusão lombar, devido à sua capacidade de ligação direta ao osso e incorporarem uma massa de fusão óssea bem-sucedida (Brødano *et al.*, 2014; Wongwitwichot *et al.*, 2014; Garin & Boutrand, 2016). Os fosfatos de cálcio são muito usados em superfícies ativas para implantes médicos, uma vez auxiliarem a ligação do implante ao osso, através de uma camada de apatite formada na superfície deste após implantação. A velocidade de formação desta camada está relacionada com o grau de bioatividade estes compostos (Pighinelli *et al.*, 2015).

Os fosfatos de cálcio são subdivididos, e a taxa de dissolução dos mesmos está representada abaixo. A dissolução físico-química está dependente do produto de solubilidade do material e do pH do meio (Allo *et al.*, 2012):



O grau de degradação destes materiais aumenta com o aumento da área superficial e diminuição da cristalinidade. Num sistema biológico, um material com maior cristalinidade, apresenta maior força biomecânica e uma estabilidade mais duradoura (Schimandle & Boden, 1997; Epstein, 2009; Russo *et al.*, 2014). Por outro lado, uma estrutura amorfa com maior grau de porosidade, melhora a atividade da interface e crescimento ósseo, mas estão associadas a uma biodegradação mais rápida do implante *in vivo*. A HAp disponível é reabsorvida muito lentamente, enquanto o TCP é degradado biologicamente 10 a 20 vezes mais rápido e reabsorvido poucos meses após implantação (Schimandle & Boden, 1997).

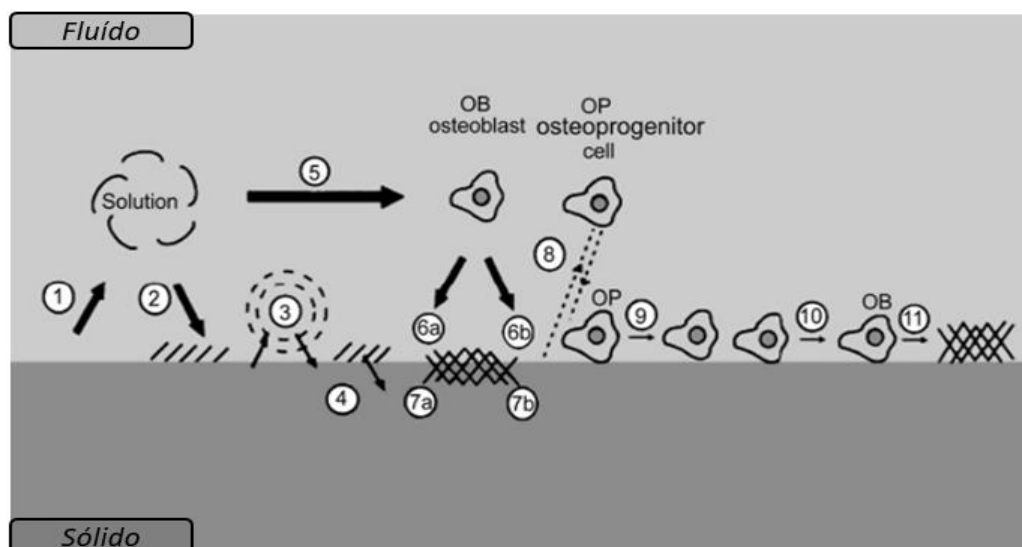


Figura 2.17 Esquema dos eventos entre a interface do implante-biocerâmicos e o ambiente biológico envolvente: (1) dissolução das biocerâmicos; (2) precipitação da solução; (3) mudança iônica e rearranjo estrutural na interface tecido/biocerâmico; (4) interdifusão a partir da camada limite da superfície para as biocerâmicos; (5) efeitos da solução mediada através da atividade celular; (6) deposição da superfície (a) inorgânica ou (b) orgânica; (7) deposição com a integração dos biocerâmicos; (8) quimiotaxia da superfície do biocerâmico; (9) anexação celular e proliferação; (10) diferenciação celular; (11) formação de matriz extracelular (retirada de Dorozhkin, 2010).

As misturas de β -TCP e HAp têm cada vez mais ganho atração no fabrico de materiais para aplicações de substituição de osso, combinando-se a excelente bioatividade da HAp e a boa biorresorbabilidade do β -TCP (Pighinelli *et al.*, 2015). A resistência mecânica e a resistência à fratura da HAp são melhoradas quando uma fase secundária de biocerâmico de menor ponto de fusão, é adicionada. Quando se mistura a HAp com o β -TCP, é possível a projeção de características das membranas, como a degradadação e características da superfície (Wongwitwichot *et al.*, 2014). A performance biológica desta mistura bifásica é controlada pela dissolução desta mistura. A mistura dissolve-se gradualmente após a exposição em ambiente fisiológico como averiguado na Figura 2.17, libertando iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} , e induzindo por sua vez o comportamento bioativo destes compostos. O material que permanece durante a dissolução destes, atua com o *template* para o novo osso formado (Pighinelli *et al.*, 2015). Num estudo *in vivo* comparativo entre *scaffolds* de β -TCP e β -TCP/HAp em ratos, os implantes HAp/TCP foram preenchidos com uma camada bem estabelecida de tecido ósseo com abundantes matrizes extracelulares ósseas. No entanto, pouco osso novo foi detetado em implantes com apenas β -TCP. Ainda foi demonstrado a formação de cristais de apatite nas superfícies de β -TCP/HAp, em que estes desempenharam papéis importantes na acessibilidade de ligação celular e retenção de células infiltradas, além de promovê-las para formar novo osso (Wongwitwichot *et al.*, 2014). O composto HAp/TCP, com ou sem adição de outros materiais, pode servir como membrana, no qual células mesenquimais crescem e se diferenciam em osteoblastos produtores de ossos, em que depois o material se degrada paralelamente com a formação de uma massa sólida de fusão óssea (Spivak & Hasharoni, 2001). Podendo assim, este tipo de membrana vir a ser uma promessa para a regeneração de tecidos duros.

2.2.4.1. Hidroxiapatite

A Hidroxiapatite, HAp, é a componente principal inorgânica do tecido osso, por isso é muito comum o uso desta em aplicações ortodônticas e ortopédicas (Allo *et al.*, 2012; Elgali *et al.*, 2017; Bi *et al.*, 2019). A sua comercialização iniciou-se em 1980 em aplicações biomédicas (Jeong *et al.*, 2019; Dorozhkin, 2010). Tem como fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, uma proporção de Ca/P de 1,67, sendo o Ca/P mais estável em meio fisiológico e em pH entre 4-12 (Kanasan *et al.*, 2017; Florea & Andronescu, 2019). A estrutura da HAp é hexagonal e formada por cátions de Ca^{2+} rodeados por tetraedros PO_4^{-3} e três unidades de íons OH^- , que ocupam colunas paralelas à sua estrutura hexagonal. Na Figura 2.18 está representada a estrutura química deste material inorgânico.

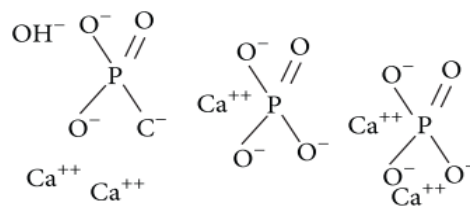


Figura 2.18 Estrutura química da hidroxiapatite (retirada de Monreal Romero *et al.*, 2013).

A hidroxiapatite tem diferentes métodos de produção de partículas e, com esses métodos, várias estruturas de diferentes materiais podem ser sintetizadas, como nanopartículas ou grãos (Monreal Romero *et al.*, 2013). Em aplicações ortopédicas, é vastamente usada em regeneração óssea em formato de pastas, cimentos, membranas como enxertos e revestimentos de implantes. A macroporosidade e a interconectividade dos poros da HAp permitem a adesão, proliferação e diferenciação de células ósseas, bem como a revascularização, e por sua vez, o crescimento de novo osso quando implantado (Wang & Yeung, 2017; Bi *et al.*, 2019). Estudos *in vivo* com este material inorgânico demonstraram um melhoramento significativo na regeneração de osso, com um aumento da diferenciação e proliferação de células ósseas; aumento da atividade osteoblástica, aumento também da área de contato entre o implante e tecido ósseo, propriedades mecânicas e biocompatibilidade (Jeong *et al.* 2019). É reconhecida por ser osteocondutora, mas não osteoindutora (Jeong *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2017). A HAp é quimicamente segura em contato com os fluidos corporais, contudo possui uma bioatividade e efeito de osteocondutividade limitada, apresentando uma taxa de reabsorção lenta (Xu *et al.*, 2017). A razão pela qual isto acontece, é que apesar da hidroxiapatite sintética e a original do osso compartilharem semelhante estrutura cristalina e composição química, a sintética apresenta diferentes tamanhos de cristal e arranjos específicos de grupos carbonato e fosfato na estrutura atômica. Estas distinções justificam a razão da hidroxiapatite ser reabsorvida tão lentamente, podendo durar anos (Garin & Boutrand, 2016), quando comparada até com o TCP, impedindo assim uma neoformação de osso mais rápida (Russo *et al.*, 2014). No entanto, o incremento da duração desta reabsorção, aumenta a rigidez estrutural do local de fusão (Garin & Boutrand, 2016). Este biocerâmico possui a propriedade mecânica inicial idêntica de um osso esponjoso, quebradiço e fraco sob tensões de cisalhamento, mas é resistente a cargas compressivas, podendo ser reduzidas (30-40%) *in situ* após a sua implantação (Wang & Yeung, 2017). Produtos

fabricados com HAp, muitas das vezes, apresentam irregularidades nas suas superfícies; no entanto isto acontece pela razão das nanopartículas de HAp não só ficarem embebidas na estrutura 3D do material, mas também se depositarem na superfície (Bi *et al.*, 2019). O uso do cerâmico de HAp no aumento da força de fixação da coluna vertebral e no aumento da força do corpo vertebral, é bastante promissor para futuras aplicações clínicas (Spivak & Hasharoni, 2001).

A HAp nanocristalina sintetizada a altas temperaturas confere uma maior relação superfície/volume, que conduz a um aumento da taxa de reabsorção (Wang & Yeung, 2017), apresentando maior estabilidade química em contacto com os fluídos corporais. As células que irão reabsorver este cerâmico, são células gigantes de corpo estranho, que interrompem a sua degradação após uma reabsorção de 2-10g de HAp, por isso grandes quantidades desta poderão permanecer no corpo até períodos de 10 anos (Schimandle & Boden, 1997).

O quitosano e a hidroxiapatite estão entre os melhores biomateriais bioativos na engenharia de tecido ósseo e são conhecidos pela sua excelente biocompatibilidade com o ambiente do corpo humano. São vastamente discutidos para fabricação de membranas compósitas, exibindo propriedades físicas, biológicas e mecânicas personalizadas. As ligações intermoleculares de hidrogénio e do *quelato* entre estes dois contribui para o aumento das propriedades mecânicas, existindo uma interação entre os grupos NH_2 e o grupo $-OH$ primário e secundário do Q com os grupos Ca^{2+} da HAp (interação de coordenação metálica) (Venkatesan & Kim, 2010). Estruturas de compósitos (Q e nHAp) demonstraram ainda resultados eficientes, com porosidade de cerca de 80 a 85%, imitando a arquitetura nativa do tecido trabecular ósseo, enquanto que as semelhanças entre o quitosano e os glicosaminoglicanos da matriz extracelular (GAGs) contribuíram para a capacidade de enxerto do compósito, aproximando-se do osso original (Aranaz *et al.*, 2017). A interação destes é demonstrado na Figura 2.19. A macroporosidade destes compósitos deve-se à presença da nHAp, que por sua vez fraqueja interações intramoleculares (como a ligação $-H$) na rede de quitosano (Teng *et al.*, 2009). Numa implantação *in vivo*, os processos bioquímicos reparadores de tecido ósseo vivo estão dependentes do conteúdo mineral das membranas, ou seja, da concentração de CaP da hidroxiapatite (Danilchenko *et al.*, 2011). Num estudo direcionado para a análise de fusão óssea, uma membrana com Quitosano/Hidroxiapatite (20:80) exibiu uma regeneração de forma consistente e bem estruturada; a membrana desapareceu 30 dias após a cirurgia com obtenção da estabilidade da coluna vertebral; as proteínas extracelulares puderam aderir à membrana; houve limitação de migração de células de tecido mole pela barreira e existiu ainda aceleração do processo de cicatrização do local lesado (Rodríguez-Vázquez & Ramos-Zúñiga, 2019).

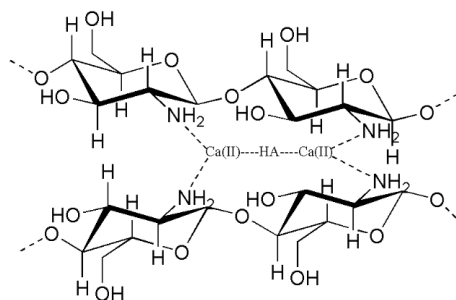


Figura 2.19 Interação química entre o quitosano-hidroxiapatite (retirada de Venkatesan & Kim, 2010).

A adição de alginato a este compósito forma um complexo polieletrólito entre os grupos carboxil do alginato e aminas protonadas do quitosano, como já dito antes, em que a CPE melhora as propriedades do quitosano, como mecânicas e estabilidade estrutural após o transplante. Além disto, há formação de fortes interações iônicas entre o alginato e grupos Ca^{2+} da hidroxiapatite, levando à produção de um rearranjo estereoquímico específico e distribuição de carga. As propriedades mecânicas das membranas compostos por estes três materiais são melhoradas principalmente pela forte interação entre o quitosano e a nHAp, que é facilitada pela distribuição uniforme de nHAp através da interação iônica entre o alginato e a nHAp. Adicionalmente, a nHAp fornece estruturas uniformes de poros, com paredes mais densas que contribuem para melhorar a resistência à compressão e o módulo elástico destes *scaffolds* (Kim *et al.*, 2015). Em comparação com membranas compostas apenas por Quitosano/Alginato de Sódio, os três materiais juntos exibem melhor diferenciação osteoblástica para regeneração óssea e o aumento do Ca^{2+} extracelular, aumenta a diferenciação de osteoblastos. Num estudo, com este tipo de membrana existiu formação de osso suficiente para abranger a maior parte do defeito ósseo. O novo tecido ósseo no local implantado apresentava não apenas osteoblastos, mas também osteoclastos (Kim *et al.*, 2015), fazendo com que este tipo de materiais sejam uma promessa para aplicações em engenharia de tecidos óssea.

2.2.4.2. β -Fosfato Tricálcico

O fosfato tricálcico (TCP), em 1920, foi o primeiro a ser usado como material artificial para reparação de defeitos ósseos (Dorozhkin, 2010; Wang & Yeung, 2017). A sua fórmula química consiste $Ca_3(PO_4)_2$, tendo uma proporção de Ca/P igual a 1.5. A sua estrutura química pode ser vista na Figura 2.20. Este cerâmico é dividido em fase α e β (Jeong *et al.*, 2019). A mais usada em regeneração óssea é a β , visto ter uma estrutura mais estável e maior biodegradação que a α . Comparativamente a razão Ca/P é menor do que a HAp, podendo aumentar parcialmente a sua degradação e absorção. Possui qualidades osteocondutoras e osteoindutoras (Azevedo *et al.*, 2014) e quando empregado em implantes, apresenta uma estrutura porosa bem interconectada, permitindo uma revascularização e crescimento de tecido ósseo (Wang & Yeung, 2017).

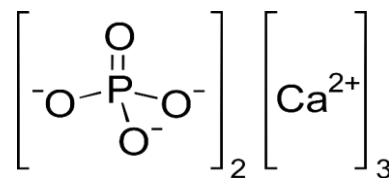


Figura 2.20 Estrutura química do β -TCP.

Este biocerâmico apresenta rápida libertação de iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} aquando a exposição em fluídos fisiológicos (Pighinelli *et al.*, 2015). A sua taxa de reabsorção e biocompatibilidade é elevada também (Jeong *et al.*, 2019; Allo *et al.*, 2012). As suas características têm sido estudadas em aplicações de regeneração óssea, onde este tem

constatado amplificar a proliferação de células osteopercursoras, como osteoblastos e células estromais da medula óssea. Devido à formação de poros em estruturas tridimensionais, permitem uma adesão celular favorável, bem como também uma excelente biomineralização (Jeong *et al.*, 2019). O β -TCP ao dissolver-se em meio fisiológico proporciona um aumento de concentração de íons de cálcio e fosfato à sua volta, que se depositam sob o material, formando uma camada, a camada de apatite, onde depois os osteoblastos vão depositar matéria mineral nessa superfície. Esta camada é indicadora de bioatividade, após uma vez o material bioativo ligar-se ao osso através dela (Zhang & Zhang, 2001). Todavia, esta cerâmica é menos estável que a HAp, apresentando maior taxa de degradação *in vivo*, podendo ter uma duração de semanas ou meses no local lesado. No que respeita à fusão lombar, um implante com TCP foi associado a uma redução de 26% volume nos primeiros 12 meses pós-cirurgia, confirmando a sua degradação longa (Garin & Boutrand, 2016). Num estudo a 100 fusões lombares posterolaterais, com o uso desta cerâmica como suplemento ao osso autoenxerto, esta contribuiu para uma artrodese lombar bem-sucedida (Epstein, 2009).

A combinação de cerâmicos com polímeros tem sido cada mais aplicada como alternativas em regeneração óssea, compósitos de quitosano e β -TCP têm sido uma opção. Azevedo *et al.* (2014), estudaram a função de *scaffolds* combinados com β -TCP/Quitosano na aplicação de defeitos ósseos, na tibia de coelhos da Nova Zelândia. Os grupos com o compósito mostraram que o TCP promoveu a mineralização da matriz óssea, com mais rápida cicatrização do tecido; mais quantidade de novo osso foi observada na interface osso/implante. Isto deveu-se à particularidade do quitosano estimular a libertação de fatores inflamatórios, que aceleram o processo de reparação, por estimulação de osteogénese. Para além disto, a cerâmica forneceu íons que favoreceram os osteoblastos a sintetizar osteóide para o processo de cicatrização.

Na Tabela 2.8 é analisado as vantagens e desvantagens destes dois cerâmicos usados no trabalho.

Tabela 2.8 Comparação entre a Hidroxiapatite (HAp) e o β - fosfato tricálcico (β -TCP) (adaptada de Spivak & Hasharoni, 2001; Epstein, 2009; Bagher *et al.*, 2012; Wongwitwichot *et al.*, 2014; Wang & Yeung, 2017; Xu *et al.*, 2017; Bi *et al.*, 2019) .

Biocerâmicos	Vantagens	Desvantagens
HAp	<p>Maior biocompatibilidade do que o β-TCP; Cristalografia semelhante com a componente principal inorgânica do osso; Osteocondutor; Propriedade hidrofóbica; Sem risco de infeção ou rejeição; Membranas com poros de diâmetro de 100 a 200 μm.</p>	<p>Degradação mais lenta <i>in vivo</i>; Pobre plasticidade; Fácil aglomeração; Piores propriedades mecânicas que o β-TCP; Não possui osteoindutividade; Menor porosidade.</p>
β-TCP	<p>Osteocondutor; Osteoindutor; Sem risco de infeção ou rejeição; Melhores propriedades mecânicas que o HAp; Membranas com poros de diâmetro de 100 a 200 μm.</p>	<p>Pior biocompatibilidade que o HAp.</p>

2.2.4.3. Biocompósitos com fosfatos de cálcio

No entanto, ainda se considera que nenhum substituto ósseo é melhor que o enxerto ósseo combinado com cerâmica (Garin & Boutrand, 2016). É por isso, que cada vez mais estudos são feitos a fim de desenvolver substitutos compósitos para melhoramento de características. O quitosano muitas vezes é reforçado com este grupo de biocerâmicos (Zhang & Zhang, 2001; Bi *et al.*, 2019), visto o grupo de iões Ca^{2+} e NH_2 (do quitosano) indicarem boa miscibilidade (Teng *et al.*, 2009), aumentando as propriedades mecânicas. Também se consegue melhorar a estabilidade do quitosano nesta junção e alterar a taxa de degradação deste polímero com esta união, devido à possibilidade destes biocerâmicos apresentarem taxas de degradação mais lentas; no entanto, tudo isto deve-se à complexação de grupos funcionais do quitosano com os iões de fosfatos de cálcio (Zhang & Zhang, 2001). Além disto, a topografia da superfície destes materiais favorece a adesão celular e a liberação de iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} das membranas, regulando a migração, proliferação e diferenciação de células ósseas. A libertação destes iões irá então regenerar osso, com base na dissolução do precursor de fosfato de cálcio, e subsequente recristalização do tecido ósseo. Além disto, ambos os materiais (quitosano e iões de cálcio fosfato) permitem o desenvolvimento de dispositivos de administração controlada (incluindo fatores de crescimento ou antibióticos entre outras moléculas de interesse) (Aranaz *et al.*, 2017).

Foi feito um estudo aprofundado das várias observações de biomateriais usados em engenharia de tecidos apresentado na Tabela 2.9, com base nos materiais utilizados na formulação das membranas deste trabalho.

Tabela 2.9 Resultados de vários estudos com os materiais usados neste trabalho.

Polímero e/ou Biomaterial	Modelo	Aplicação	Observações	Referências
Quitosano e β -TCP	<i>in vitro</i>	Fabrico de <i>scaffolds</i> compósitos para aplicação em engenharia de tecidos óssea	<p>I. Morfologia e análise estrutural: menor concentração de β-TCP, poros mais irregulares e formação de macroporos; porosidade foi próxima de 90%;</p> <p>II. Propriedades Mecânicas: maior concentração de β-TCP, material apresentou-se menos elástico e deteve maior força compreensiva;</p> <p>III. Citotoxicidade: nula e na amostra com menor teor de cerâmico, observou-se maior quantidade de células vivas (MG63).</p>	(Kucharska <i>et al.</i> , 2012)
Quitosano e HAp	<i>in vivo</i>	Examinação do comportamento <i>in vivo</i> de estruturas de Q/HAp colocadas num defeito tibial	<p>I. Morfologia e análise estrutural: a cristalinidade diminui à medida que o conteúdo de quitosano aumenta; quanto mais Q estiver presente no compósito, menor será o tamanho médio dos cristais de apatite;</p>	(Danilchenko <i>et al.</i> , 2011)

			<p>II. Bioatividade: os íons cálcio e fósforo no defeito, fizeram com que a restauração do osso fosse mais rapidamente, demonstrando osteocondução;</p> <p>III. Biodegradação: <i>scaffolds</i> sofreram biodegradação quase completa. Esta substituição do implante de Q/Hap por tecido ósseo recém-formado, em ratos, ocorreu no 24º dia de implantação;</p> <p>IV. Avaliação <i>in vivo</i>: cinco dias após o implante, os poros de Q/HAp foram preenchidos com as células ósseas para o processo osteoreparativo. A partir do 10º dia, observou-se a integração de Q/HAp no tecido recém-formado e, no 24º dia, ocorreu a substituição do implante por novo osso.</p>	
Quitosano e HAp	<i>in vivo</i>	Membrana de Q/Hap para induzir regeneração óssea e fusão espinhal	<p>I. Análise <i>in vivo</i>: a membrana de Q/HAp (20:80) exibiu uma fusão mais sólida que o grupo controle; a interface do implante com o meio consistiu em deposição de colagênio e novo osso; a membrana desapareceu 30 dias após a cirurgia com obtenção da estabilidade da coluna vertebral; as proteínas extracelulares puderam aderir à membrana; a regeneração deu-se de forma sólida e bem estruturada; houve limitação de migração de células de tecido mole pela barreira; e ainda houve aceleração do processo de cicatrização.</p>	(Rodríguez-Vázquez & Ramos-Zúñiga, 2019)
Quitosano Alginato e HAp	<i>in vivo</i>	Regeneração óssea no crânio de ratos com uso a <i>scaffolds</i> compósitos	<p>I. Morfologia e análise estrutural: o complexo polieletrólito de Q/A é altamente poroso e interconectado com um tamanho de poro de cerca de 50-220 µm; a estrutura de poros foi semelhante ao complexo polieletrólito a um baixo conteúdo de HAp; o tamanho do poro diminuiu com o aumento do teor de HAp, e acima de 30% da HAp, a estrutura do poro entrou em colapso local; a porosidade dos <i>scaffolds</i> compósitos variou entre 84,98 e 74,54%;</p> <p>II. Biocompatibilidade: <i>scaffolds</i> compósitos não exibiram efeitos citotóxicos em células MG-63 e possuíram boa biocompatibilidade</p>	(Jin <i>et al.</i> , 2012)

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANO
PARA APLICAÇÃO NA REGIÃO LOMBAR

				<p>favorável à fixação celular e ao crescimento de novo tecido ósseo. Especialmente, no compósito com 30% HAp houve melhor biocompatibilidade e osteocondutividade para engenharia de tecido óssea; não foram observados sinais inflamatórios ou reações adversas nos tecidos; o tecido ósseo recém-formado preencheu a área do defeito ósseo no local implantado com o <i>scaffold</i> após 8 semanas in vivo, enquanto que não foi observado novo tecido na análise controlo.</p>	
Quitosano Alginato e nHAp	<i>in vitro</i>	Caracterização de <i>scaffolds</i> compósitos com vários teores de nHAp para regeneração óssea	<p>I. Morfologia e análise estrutural: a adição de nHAp contribuiu para estruturas porosas interconectadas;</p> <p>II. Propriedades mecânicas: a resistência à compressão aumentou e o módulo elástico melhorou com o aumento do conteúdo de nHAp;</p> <p>III. Biocompatibilidade: nula citotoxicidade;</p> <p>IV. Bioatividade: houve um aumento da biomineralização e osteogênese com a adição de nHAp.</p>	(Kim <i>et al.</i> , 2015)	
Quitosano e β-TCP	<i>in vitro</i>	Caracterização de <i>scaffolds</i> com adição de fosfatos de cálcio	<p>I. Morfologia e análise estrutural: diâmetro dos poros diminuiu com o aumento de β-TCP; a estruturas dos poros de Q/β-TCP apresentaram poros com formato circular;</p> <p>II. Propriedades mecânicas: com a adição do β-TCP houve um aumento no módulo de compressão;</p> <p>III. Bioatividade: formação da camada de apatite, onde osteoblastos podem depositar minerais para formação de matriz óssea.</p>	(Zhang & Zhang, 2001)	
Quitosano e nHAp	<i>in vitro</i>	Membranas para regeneração óssea guiada para prevenção de crescimento de tecidos moles	<p>I. Morfologia e análise estrutural: membranas de nHA/Q com <30% de nHA apresentaram-se intactas, fortes e com superfícies lisas em ambos os lados; membranas com nHA/Q em comparação com as de Q só, mostraram mais rugosidade e microporosidade; e as que apresentavam nHA >30% tinham mais poros interconectados e maiores;</p>	(Teng <i>et al.</i> , 2009)	

			<p>II. Propriedades mecânicas: HA/Q menor resistência à tensão, mas maior módulo elástico que as membranas com Q; no entanto, a um aumento da HA, levou a uma diminuição das propriedades mecânicas devido à maior porosidade com o conteúdo de HA;</p> <p>III. Biopatibilidade: maior crescimento celular nas membranas compósitas.</p>	
Quitosano Alginato de sódio e HAp	<i>in vitro</i>	Microesferas para sistemas de liberação em engenharia de tecidos óssea	<p>I. Morfologia de superfície: com o aumento da concentração de Alginato, houve um aumento de dispersão das microesferas; amostras sem HAp apresentaram uma superfície mais lisa e com o aumento de HAp, deu-se o aumento de rugosidade;</p> <p>II. Biopatibilidade: amostras com HAp/AS e HAp/AS/Q indicaram boa compatibilidade com o sangue (amostras apresentaram atividade hemolítica <2%); e em testes de viabilidade celular todas as amostras apresentaram um nível acima de 90%. As amostras com HAp/AS/Q apresentam níveis adesão celular e proliferação acima das outras, demonstrando potencialidade em reparação óssea.</p>	(Bi <i>et al.</i> , 2019)
Quitosano e HAp	<i>in vitro</i>	Estudo da macroporosidade por liofilização	<p>I. Morfologia e análise estrutural: maior conteúdo de de HAp aumentou a interconectividade entre as camadas da amostra e porosidade de cerca de 80 a 85%;</p> <p>II. Biocompatibilidade: maior conteúdo de HAp afetou fortemente a eficácia da proliferação celular, isto é, quanto maior o teor de fosfato de cálcio no compósito, melhor a ligação e proliferação celular. Neste caso, os sais de CaP agiram como precursores adequados para a regeneração do tecido ósseo, e os <i>scaffolds</i> mais enriquecidos com CaP foram capazes de regular positivamente os primeiros passos de adesão.</p>	(Aranaz <i>et al.</i> , 2017)

2.2.5. Reticulação Química

O osso como explicado anteriormente, é um tipo de tecido conjuntivo caracterizado pela sua rigidez e dureza. As estratégias desenvolvidas de forma a contornar problemas associados a este tecido, nomeadamente a membrana, necessitam de vários pré-requisitos. Um dos mais importantes neste tecido duro é mesmo a propriedade mecânica. Uma vez, a membrana poder encontrar-se no local lesado durante um certo período, devendo mimetizar a matriz óssea, é natural que esta tenha de ser reforçada. Os polímeros naturais têm a desvantagem de terem fracas propriedades mecânicas e muitas das vezes após implantação serem degradados, não fornecendo a função destinada. Por isso, o uso de pequenas moléculas denominadas agentes de reticulação têm trazido um papel essencial na melhoria destes materiais para o suporte e formação de novo tecido ósseo.

A estratégia de reticulação tem como intenção modificar propriedades mecânicas, biológicas e de degradação em biomateriais com características específicas (composição e estrutura) para uma dada aplicação desejada, neste caso o osso. A reticulação em membranas constitui uma das estratégias mais importantes para melhoria das características biomecânicas da rede destas, estabelecendo-se entre 2 grupos funcionais numa cadeia polimérica, através de ligações covalentes ou não-covalentes, como exibido na Figura 2.21 (Krishnakumar *et al.*, 2019). Os agentes de reticulação mais comuns caracterizam-se por serem compostos bifuncionais simétricos com grupos reativos, com especificidade nos grupos funcionais das macromoléculas da matriz (Azeredo & Waldron, 2016). É importante referenciar que o método de reticulação está dependente da natureza da estrutura química do biopolímero. Existem vários métodos de reticulação: física, química, enzimática e não-enzimática (Krishnakumar *et al.*, 2019). A reticulação química em comparação com os outros tipos de reticulação possui a vantagem de formar ligações mais fortes (Oryan *et al.*, 2018), sendo este o método estudado neste trabalho.

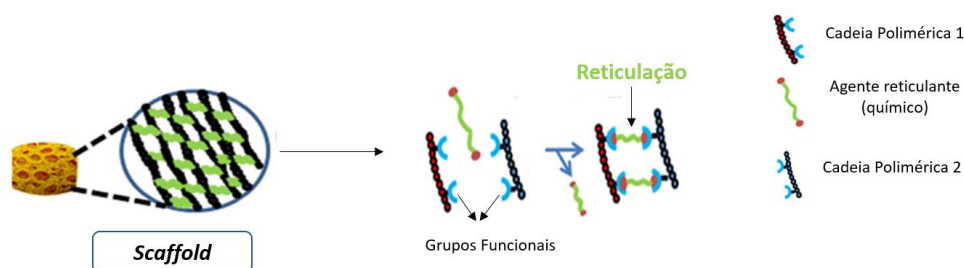


Figura 2.21 Esquema da rede 3D de um *scaffold* (membrana) polimérico reticulado quimicamente (adaptada de Krishnakumar *et al.*, 2019).

A reticulação possibilita a redução da mobilidade da estrutura de um polímero, aprimorando as propriedades mecânicas e de barreira, aumentando a sua resistência à água e reduzindo o inchaço e volume livre. Leva ainda a um retardamento da degradação do material em causa (Azeredo & Waldron, 2016). A reticulação química em polissacarídeos é um método muitíssimo versátil que oferece boa estabilidade mecânica (Patil, 2008). Os agentes de reticulação mais comumente usados são aldeídos de cadeia curta, no entanto têm sido relatados como potencialmente tóxicos (Azeredo & Waldron, 2016). Durante o processo de reticulação, o agente reticulante reage com os polissacarídeos formando ligações

intermoleculares ou intramoleculares. Os fatores que podem afetar este processo são o tempo de reticulação e a concentração de agente reticulante. Uma maior concentração deste, induzirá uma reticulação mais rápida (Patil, 2008).

2.2.5.1. Glicoxal – Agente Reticulante

O glicoxal é um composto orgânico, do grupo dos aldeídos (α -oxoaldeído reativo), muito usado como agente reticulante em vários tipos de polímeros como o quitosano, celulose e colagénio (Shangari & O'Brien, 2004; Oryan *et al.*, 2018). A sua estrutura química é apresentada na Figura 2.22.

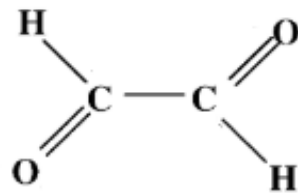


Figura 2.22 Estrutura química do glicoxal (agente reticulante) (retirada de Yang *et al.*, 2005).

O quitosano possui grupos amina e hidroxil reativos, os quais permitem que o quitosano sofra modificações químicas a fim de melhorar as propriedades mecânicas, solubilidade, estabilidade química e propriedades catiónicas e aniónicas (Baran, 2016). Yang *et al.* (2005), indicaram que a reticulação do glicoxal com o quitosano se dá entre esses dois grupos (amina e hidroxil) como demonstrado na Figura 2.23. Foi notado que as propriedades mecânicas de fibras de quitosano reticulas com glicoxal foram melhoradas, devido à ocorrência de acetilação e reações de base de Schiff entre o glicoxal e os grupos referidos antes, do polissacarídeo. Observou-se ainda um maior grau de reticulação do quitosano com um aumento de pH até 4, sendo o ambiente ácido o mais favorável para tal.

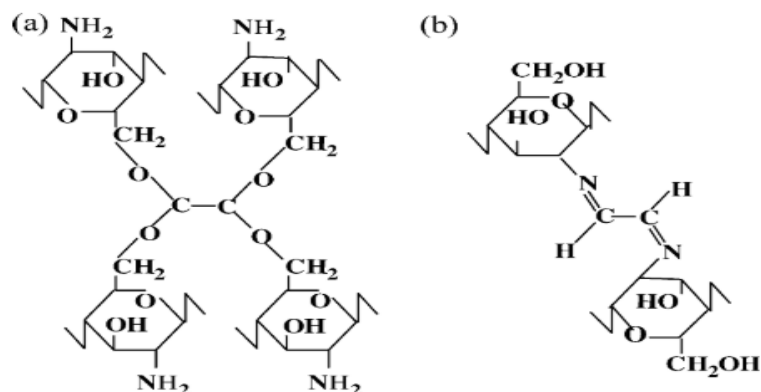


Figura 2.23 Mecanismo de reticulação do glicoxal com o polímero de quitosano, (a) glicoxal reage com os grupos hidroxil do quitosano, (b) glicoxal reage com os grupos amina do quitosano (retirada de Yang *et al.*, 2005).

Foi indicado em (Wang & Stegemann, 2011) num estudo de reticulação do glioxal entre o colagénio e quitosano, que células não foram danificadas pela exposição ao glioxal, quando concentrações são mantidas abaixo de aproximadamente 1 mM, mesmo em tempos de exposição até 15 h. Neste mesmo estudo, observou-se que a reticulação em matrizes 3D com glioxal pode modular a função celular. A proliferação celular nas estruturas reticuladas foi menor do que nas não reticuladas. Esta diferença foi atribuída à menor disponibilidade de locais de ligação celular em materiais reticulados, uma vez o quitosano e o colágeno serem ligados pela ação do glioxal. Também foi indicado que esta reticulação não reduziu as propriedades osteocondutoras dos materiais quitosano/colágeno. É então concluído, que materiais mais reticulados são mais rígidos, e pode-se ainda assim assegurar que o glioxal contribui para uma matriz aprimorada nos locais de lesão óssea, de modo a acelerar a cicatrização óssea.

Posto isto, pode-se afirmar que o glioxal é um potencial composto para reticulação de biocompósitos em regeneração óssea.

2.2.6. Técnicas de Fabrico de Membranas

A nível in vivo, os tecidos estão organizados em estruturas repetidas 3D, sendo estas estruturas a base de coordenação de processos multicelulares e sustento mecânico para sistemas biológicos. As membranas são delineadas para atingir o desenvolvimento 3D celular, fornecendo o sustento mecânico ao reparo celular. O sucesso para o fabrico destas na aplicação em engenharia de tecidos deve-se (Eltom *et al.*, 2019) a dois níveis:

- Nível microscópico: conter um ambiente apropriado para a sobrevivência e função celular;
- Nível macroscópico: reconstrução de tecido intercalado com processos coordenados multicelulares, fornecendo um transporte benéfico de nutrientes e suporte mecânico.

Ao longo dos anos, vários métodos de fabrico de construções biomiméticas 3D de membranas têm sido exploradas para aplicação em engenharia de tecidos e medicina regenerativa (Lu *et al.*, 2013). Estas técnicas de fabrico dividem-se em dois grupos: os convencionais (apresentados na Tabela 2.10) e rápida prototipagem (Lu & Eter, 2017; Eltom *et al.*, 2019; Florea & Andronescu, 2019).

- *Rápida Prototipagem:*

Tecnologia que foi alcançada com o desenvolvimento da indústria computacional. O seu principal objetivo é possibilitar a criação de membranas personalizadas em pacientes. Estas membranas são geradas a partir de design auxiliado por um computador, onde depois são impressas em 3D por um jato de tinta, camada a camada. São usados materiais líquidos, sólidos ou pós. Neste processo há controlo de porosidade, tamanho de poros, interconectividade, forma e tamanho do material. As propriedades mecânicas são melhoradas

neste fabrico em comparação com os materiais convencionais (Iu & Eter, 2017; Eltom *et al.*, 2019; Florea & Andronescu, 2019).

Tabela 2.10 Métodos convencionais para fabrico de *scaffolds* com base polimérica em engenharia de tecidos.

Método Convencional	Princípio do mecanismo	Vantagens	Desvantagens	Referências
<i>Solvent Casting and Pratical Leaching</i>	É o método convencional mais usado. O solvente é combinado com partículas uniformemente distribuídas com um certo tamanho, de modo a dissolver com a solução de polímero. O solvente é depois removido por evaporação, deixando a matriz polimérica com as partículas, onde de seguida, se submersa em água, e estas partículas dissipam-se para formar uma estrutura porosa.	Custo; Simplicidade; Controlo de poros e porosidade (50-90%) pela taxa de polímero/partícula e tamanho da partícula adicionada.	Solventes tóxicos; Interconetividade limitada (10-30%); Dificil remoção de partículas solúveis no interior da matriz.	(Iu & Eter, 2017; Eltom <i>et al.</i> , 2019)
<i>Gas-Foaming</i>	Usado para fabrico de espumas poliméricas altamente porosas sem o uso de solventes orgânicos, geralmente usa-se o CO_2 . O polímero é moldado com o CO_2 , até que atinga o ponto de estar saturado dele, onde por sua vez, há criação de uma instabilidade termodinâmica que é provocada pela rápida libertação do gás na estrutura polimérica. As membranas apresentam interconectividade, com poros de diâmetro de 100 μm e porosidade elevada.	Poros com diâmetro de 100 μm ; Porosidade até 93%.	A matriz pode ter poros fechados.	(Iu & Eter, 2017; Eltom <i>et al.</i> , 2019)
<i>Thermally Induced Phase Separation</i>	Este processo ocorre quando uma solução homogénea de polímero torna-se termodinamicamente instável sob certas condições de temperatura, e tende-se a separar num sistema multifásico, consistindo numa fase pobre em polímero (com uma baixa concentração de	A temperatura baixa pode ser usada para integrar moléculas bioativas; Porosidade acima de 90%.	Usado apenas para termoplásticos.	(Iu & Eter, 2017; Eltom <i>et al.</i> , 2019)

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANO
PARA APLICAÇÃO NA REGIÃO LOMBAR

	<p>polímero) e uma fase rica em polímero (com alta concentração de polímero). Posteriormente, a fase rica em polímero solidifica para formar uma matriz/rede, enquanto a fase pobre transforma-se em poros como resultado da remoção do solvente. A separação de fase induzida termicamente pode ser dividida em separação de fase sólido-líquido e separação de fase líquido-líquido. O processo de separação de fase sólido-líquido é usado para induzir a cristalização de uma solução de polímero, diminuindo a temperatura, o que leva à formação de poros após a remoção dos cristais de solvente.</p>			
<p>Electrospinning</p>	<p>Tecnologia para produção de fibras com diâmetros a nanoescala (<100 nm) e microescala (>1 µm). São necessárias uma bomba de seringa, uma fonte de alta tensão e um coletor. Quando a carga elétrica ultrapassa a tensão de superfície da solução do polímero, um jato deste é direcionada para o alvo, seguido de evaporação de solvente. As fibras, que variam de nanômetros a micrômetros pois podem ser reguladas a partir de certos parâmetros, incluem propriedades intrínsecas da solução, como a viscosidade, condutividade, tensão superficial e condições operacionais (incluindo a pressão hidrostática no tubo capilar, força do campo elétrico aplicado e distância entre a ponta e o coletor).</p>	<p>Técnica de produção de fibras a nano e microescala em engenharia de tecidos; Viabilidade celular <80%; Mistura homogênea de fibras com alta força.</p>	<p>Solventes tóxicos; Processo dependente de várias variáveis; Estrutura 3D fraca, com poucos poros.</p>	<p>(Iu & Eter, 2017; Eltom <i>et al.</i>, 2019)</p>

Freeze-Drying	<p>A liofilização surgiu como um processo de secagem para converter soluções de materiais em materiais sólidos. Consiste na remoção de água (ou outro solvente), do material que se encontra congelado por vapor de água (sublimação), sem passar pelo estado líquido. Os locais que estavam preenchidos por ela formam assim uma estrutura porosa na membrana final. Este processo, após o congelamento das amostras, ocorre num liofilizador.</p>	<p>Evita altas temperaturas que podem diminuir a atividade fatores biológicos integrados; Viabilidade celular <90%; Porosidade controlável.</p>	<p>Consumo de energia elevado; Solventes citotóxicos; Tamanho de poros irregulares.</p>	<p>(Iu & Eter, 2017; Eltom <i>et al.</i>, 2019)</p>
----------------------	---	--	---	---




Capítulo 3. Materiais e Métodos

3.1. Preparação das Membranas para a Regeneração Óssea

3.1.1. Reagentes Químicos

Os reagentes químicos usados neste trabalho, bem como alguns já discutidos anteriormente, apresentam-se na Tabela 3.1, especificando fórmula química, fornecedor e número de registo no *Chemical Abstracts Services* (CAS). As regras de manuseamento e especificações para cada reagente encontram-se no Anexo B.

Tabela 3.1 Lista dos reagentes químicos utilizados e suas especificações.

Reagente Químico	Fórmula Química	Fornecedor	CAS	Foto da Embalagem
Alginato de Sódio	$(NaC_6H_7O_6)_n$	Alfa Aesar	9005-38-3	
Ácido Acético	CH_3CO_2H	Sigma-Aldrich	64-19-7	—
Glioxal	$C_2H_2O_2$	Alfa Aesar	107-22-2	
Quitosano	$(C_6H_{11}NO_4)_n$	ACROS (ORGANICS)	9012-76-4	

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um biocompósito à base de quitosano e alginato de sódio, com os propósitos explicados no capítulo anterior,

nomeadamente aumento de biocompatibilidade, estabilidade química e hemocompatibilidade. Numa primeira fase de teste, a solução de quitosano foi dissolvida em ácido láctico e alginato em água destilada, no entanto os resultados não foram os expectáveis, tendo-se por isso pensado noutra formulação. Foram preparadas membranas com alginato de sódio e quitosano, 1) ambas dissolvidas em ácido acético, e 2) o quitosano foi dissolvido em ácido láctico, enquanto o alginato de sódio em ácido acético. Comparando estes dois métodos, melhores resultados visuais e resistência foram conseguidos para as membranas de alginato de sódio/quitosano dissolvidas ambas em ácido acético, chegando-se assim a uma formulação base. À mistura alginato de sódio/quitosano foi também adicionado glioxal, a fim de reticular e como tal reforçar a estrutura mecânica das membranas e aumentar a estabilidade do biocompósito, sendo que a aplicação deste biocompósito compreende tecidos duros, necessitando de maior resistência que tecidos moles. A integração de fosfatos de cálcio (hidroxiapatite e β -TCP), materiais que foram fornecidos pela empresa Artur Salgado, SA, vão proporcionar o aumento de resistência mecânica das membranas, e ao mesmo tempo um aumento de propriedades bioativas no biocompósito, como a osteocondução, que permite uma diminuição no tempo de regeneração óssea.

3.1.2. Procedimento Experimental

A preparação das amostras foi dividida em 4 fases distintas, mas dependentes entre si. Na Figura 3.1 é possível visualizar os vários passos do método experimental de fabricação das membranas estudadas.

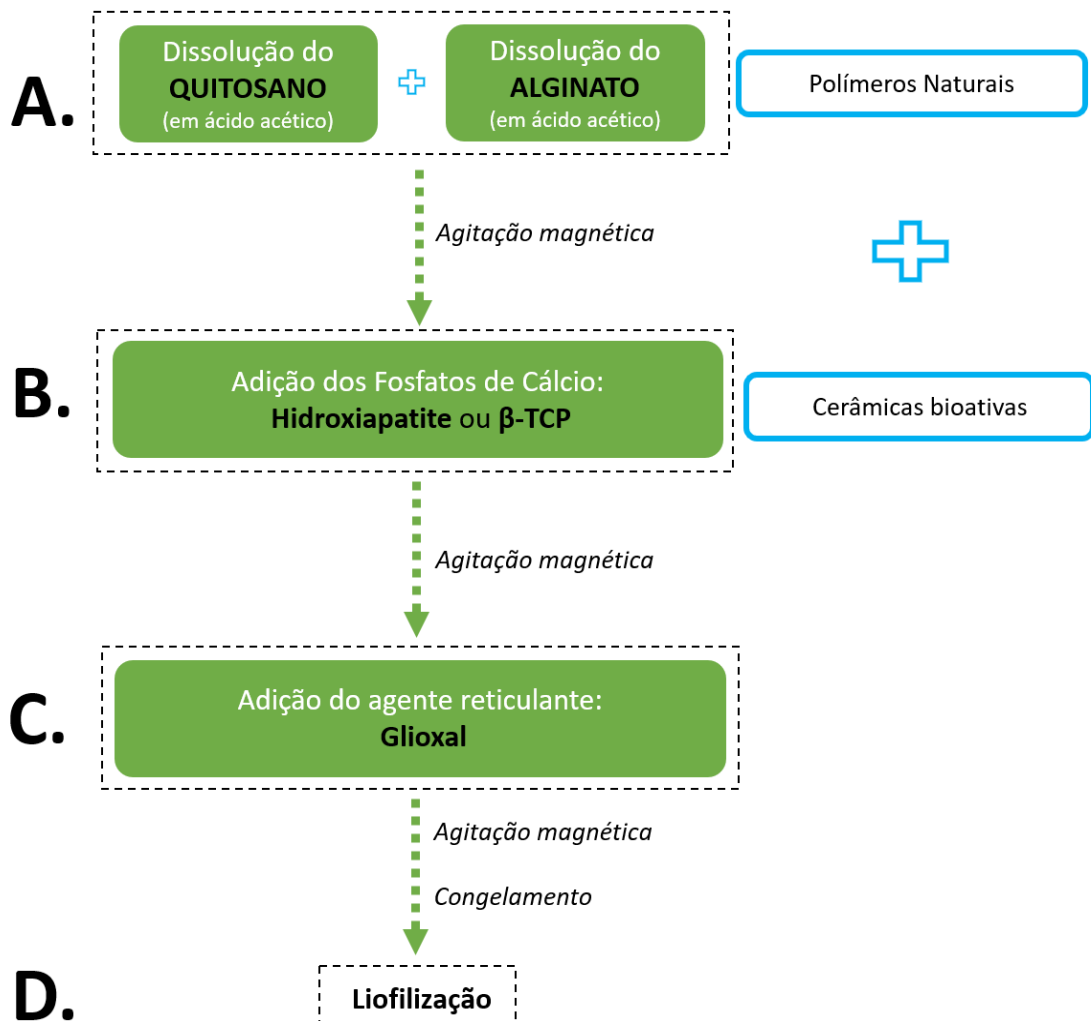


Figura 3.1 Diagrama de fluxo das várias etapas do método experimental das membranas para regeneração óssea.

A seleção desta formulação teve por base um estudo antecedente a este. No entanto, no decorrer deste trabalho, várias adaptações às proporções dos reagentes foram realizadas, a fim de otimizar o procedimento. Na Tabela 3.2 estão dispostas as concentrações percentuais que foram usadas na mistura inicial.

Tabela 3.2 Proporção usada por cada reagente químico no método experimental da mistura inicial.

Reagente Químico	Concentração percentual
Alginato de Sódio	2% (m/v)
Ácido Acético	1% (v/v)
β -TCP	1% (m/v)
Glioxal	1% (v/v)
nanohidroxiapatite	1% (m/v)
Quitosano	2% (m/v)

A. Preparação das soluções de quitosano e alginato de sódio: Primeiramente, como já referido antes, a formulação otimizada compreendeu a dissolução isolada de ambas as amostras, alginato e quitosano, numa solução diluída de ácido acético. A solução diluída consistiu em 1% (v/v) de ácido acético num balão de diluição de 100 mL de água destilada, em que se deixou sob agitação magnética durante 60 minutos. Após tal, pesou-se, numa balança, 2% (m/v), 0.1g, de quitosano, onde foi colocado num gobelé com 5 mL da solução diluída de ácido acético. O mesmo foi feito com o alginato de sódio, pesou-se 2% (m/v), 0.1g, deste e foi colocado num gobelé com 5 mL de solução diluída. Deixaram-se as amostras em agitação magnética à temperatura ambiente (17°C) durante a noite como é visto na Figura 3.2. Após a dissolução completa de cada uma, procedeu-se à sua junção, obtendo-se assim uma solução de 10 mL com os dois biopolímeros, quitosano e alginato de sódio. Voltou-se a colocar o gobelé, agora com 10 mL de solução, em agitação durante um período de 40-60 minutos. No final deste período, fez-se a medição de pH, obtendo-se o valor 4, sendo a solução ácida.

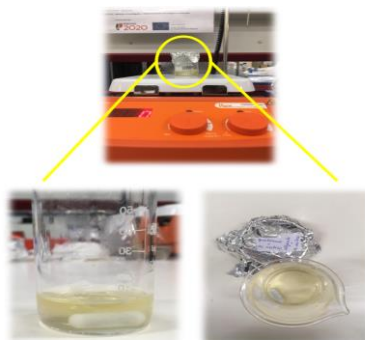


Figura 3.2 Dissolução da solução de alginato de sódio e quitosano.

Nesta fase foi notado que apenas a agitação magnética sem temperatura era eficaz, sendo que a agitação ultrassônica, muitas das vezes, deixava as amostras gelificadas, e por sua vez difíceis de se dissolverem. Na Figura 3.3 é representada a interação química e a reação química entre estes dois polímeros.

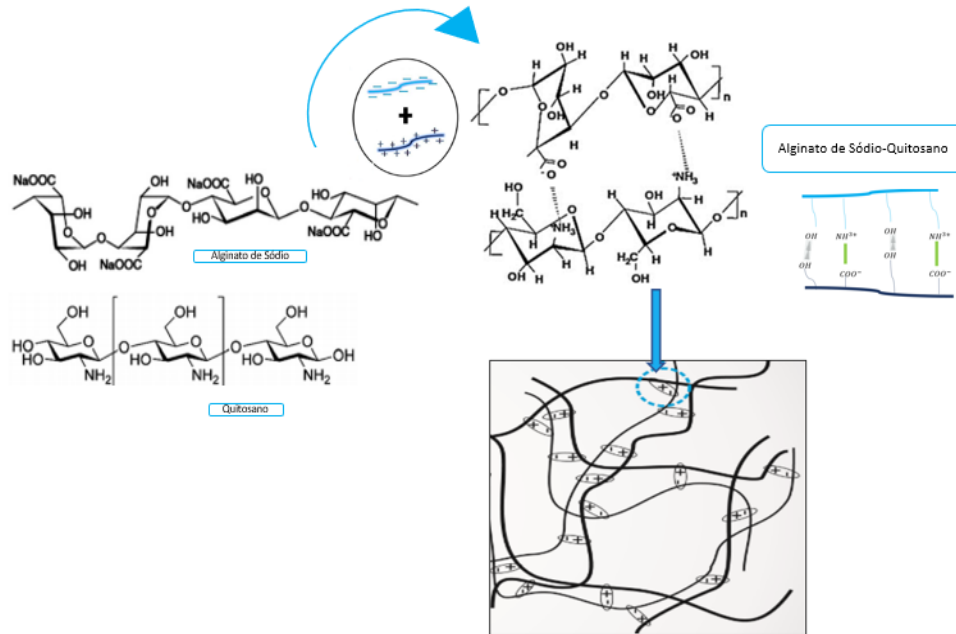


Figura 3.3 Representação esquemática da interação molecular entre o alginato de sódio e o quitosano (adaptada de Sg & Sh, 2017; Gierszewska *et al.*, 2018).

B. Adição dos fosfatos de cálcio: É de salientar que a ordem de junção dos biopolímeros e os fosfatos de cálcio é importante, evitando-se interação entre as partículas de fosfatos de cálcio e as soluções de alginato e quitosano, a fim de haver maior homogeneidade na membrana final. Os pós de fosfatos de cálcio, nHAp e β -TCP, foram pesados no valor de 1% (m/v), 0.1g, e adicionados individualmente à solução obtida na parte A, ou seja, alginato/quitosano. Também foi preparada uma mistura de TCP (0.07g) com HAp (0.03g) nas amostras, com base na proporção do estudo de Wongwitwichot *et al.* (2014), onde verificaram que *scaffolds* com esta formulação têm melhores resultados comparado com fosfatos de cálcio utilizados sozinhos.

As amostras foram agitadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente, e pH igual a 4.

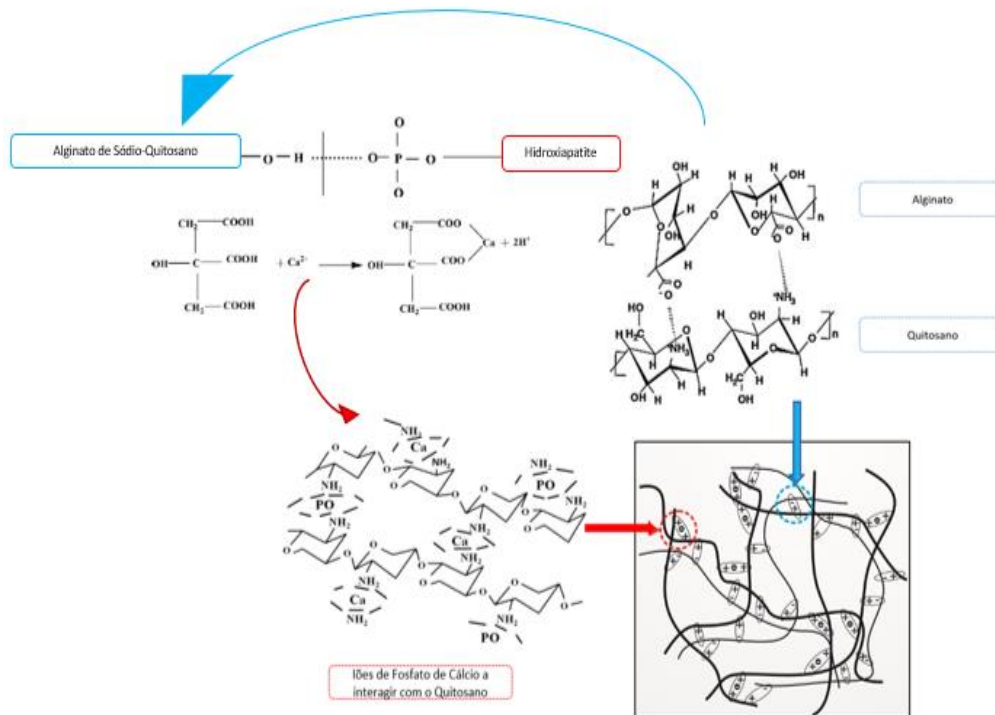


Figura 3.4 Interação química entre o quitosano e a nanohidroxiapatite e mecanismo de reação entre os polímeros e a nanohidroxiapatite (adaptada de Gierszewska *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2018).

Todas as membranas tiveram a mesma base polimérica de alginato de sódio e quitosano. A adição dos fosfatos de cálcio é importante para explorar e comparar o seu efeito nas membranas. Formaram-se assim quatro grupos de amostras como é visível na Figura 3.5 também onde:

- **AQ:** Mistura apenas de sódio-quitosano (1:1);
- **H:** Grupo compósito com alginato de sódio-quitosano & nanoHidroxiapatite (1:1:1);
- **B:** Grupo compósito alginato de sódio-quitosano & β -TCP (1:1:1);
- **BH:** Grupo compósito alginato de sódio-quitosano & β -TCP-nanoHidroxiapatite (1:1:0.07:0.03).



Figura 3.5 Amostras de alginato de sódio e quitosano (AQ) com a adição de fosfatos de cálcio (B, H e BH), visualizando-se a cor esbranquiçada.

C. Adição do agente reticulante: De modo a aumentar a resistência mecânica das membranas, foi adicionado às diferentes formulações um agente reticulante, o glicoxal. Adicionou-se então 1% (v/v) de glicoxal na mistura, e colocaram-se as amostras, uma última vez, em agitação magnética durante 30 minutos. Mediu-se novamente o valor de pH após a meia hora, dado um valor igual a 4. Na Figura 3.6 é representada a reação química entre o glicoxal e o quitosano.

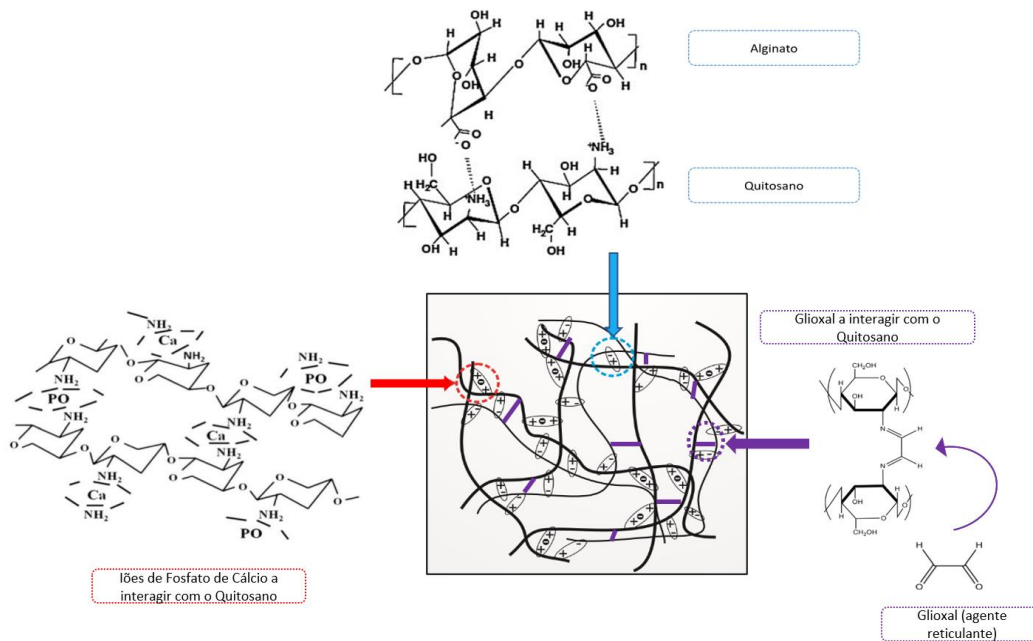


Figura 3.6 Mecanismo de interação entre a rede polimérica (quitosano-alginato) e os íons de fosfato de cálcio, mais o agente de reticulação, o glicoxal (adaptada de Pighinelli *et al.*, 2015; Baran, 2016; Gierszewska *et al.*, 2018).

D. Congelamento e liofilização: Nesta etapa, colocou-se a solução final das amostras na uma caixa de *petri* tapou-se com papel de alumínio, e de seguida colocaram-se a congelar ($T = -18^{\circ}\text{C}$). Depois de congeladas as amostras foram liofilizadas e obtidas as membranas na sua forma final como é possível observar na Figura 3.7. É de reportar, que cada membrana preparada não foi completamente idêntica visualmente, por isso é importante haver uma reprodutibilidade alargada para que se possa replicar ao máximo membranas semelhantes.

Depois e preparadas as membranas, procedeu-se à sua caracterização, por espectroscopia de infravermelhos (FTIR), difração de raios-X (DRX), microscopia eletrónica de varrimento (MEV), espectroscopia de aniquilação de positrões (EAP) e avaliação da degradação em água destilada, porosimetria pelo método do etanol, a fim de inferir sobre a potencialidade destas membranas para a regeneração óssea.

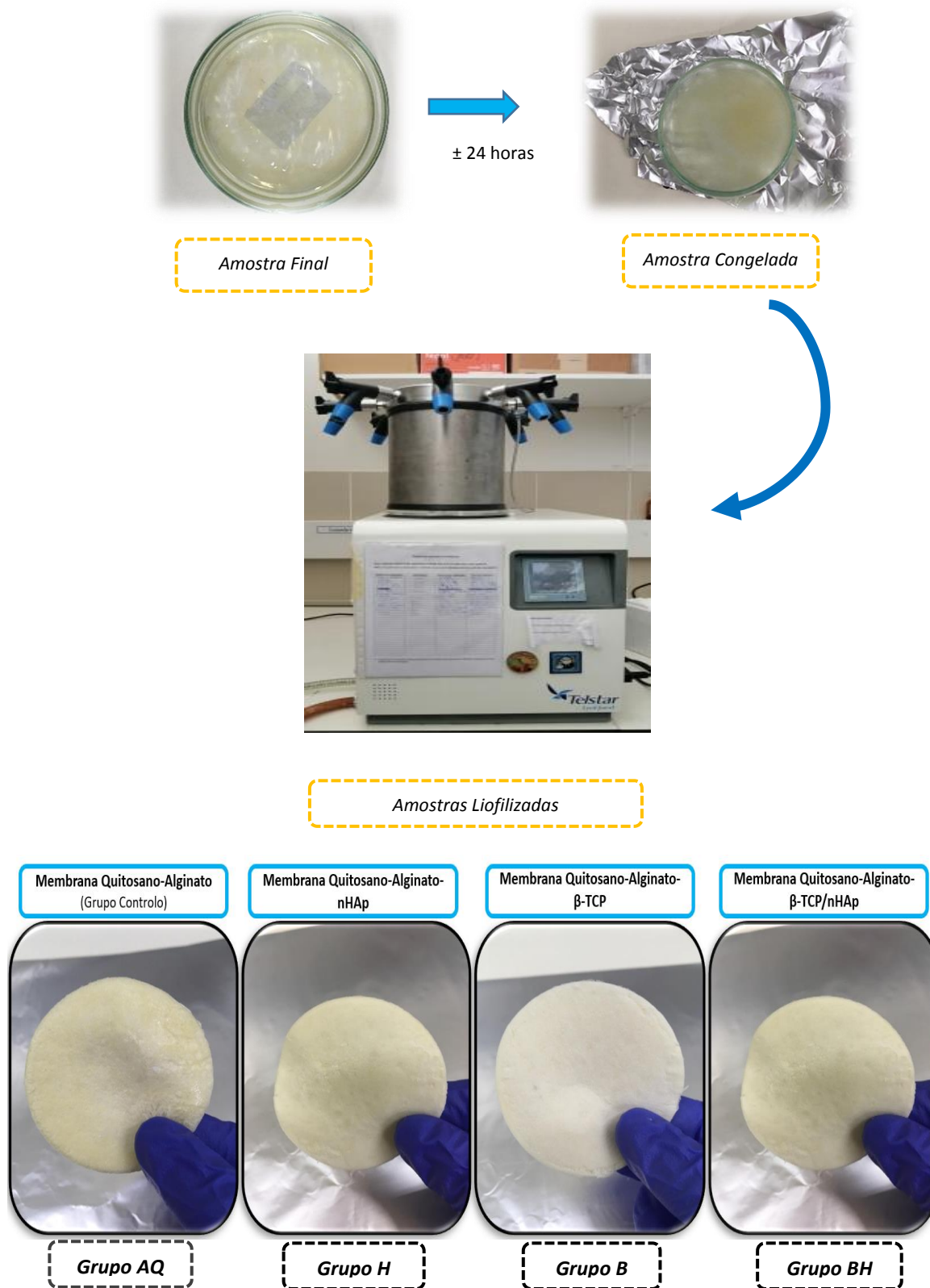


Figura 3.7 Etapa de congelamento e liofilização com os diferentes tipos de membranas em estudo.

3.2. Técnicas de Caracterização Morfológica e Físico-Química das Membranas

Nos subcapítulos seguintes são descritas as várias técnicas que foram usadas para caracterizar as membranas em análise neste trabalho.

De forma a analisar a morfologia e estrutura química das membranas usaram-se técnicas de espectroscopia de aniquilação de positrões (EAP), espectroscopia de infravermelhos (FTIR), difração de raios-X (DRX) e métodos como a porosimetria em etanol e teste de degradação com água destilada; também se avaliou a perda de massa das membranas a diferentes temperaturas por análise termogravimétrica (TGA). A finalidade destas análises foi confirmar uma simbiose de resultados para a potencialidade destes materiais.

3.2.1. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia baseia-se na interação da radiação eletromagnética com a matéria e nomeadamente o estuda os níveis de energia de moléculas ou átomos. A radiação infravermelha (IV) localiza-se entre a região do visível e microondas do espectro eletromagnético. O seu espectro é formado como consequência da absorção dessa radiação em frequências que se correlacionam com a vibração de conjuntos específicos de ligações químicas de uma molécula. Os grupos funcionais de cada molécula absorvem uma dada frequência particular, que possibilita que através da transformada de Fourier seja elaborado um gráfico de intensidade radiação versus frequência (Duygu *et al.*, 2009; Coates, 2006), podendo assim serem caracterizado materiais orgânicos e inorgânicos.

Recorreu-se ao uso do espectrómetro da Figura 3.8, *Frontier-Perkin Elmer Fourier Transform Infrared (FT-NIR/MIR)*, para identificar os grupos funcionais presentes nos compostos usados para fabricar as membranas (quitosano, alginato de sódio e fosfatos de cálcio). Os espectros foram coletados na região entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução de 4.0 cm^{-1} e 64 scans/acumulações. Com recurso ao acessório UATR (*Universal Attenuated Total Reflectance*), no qual as amostras foram submetidas a uma pressão de 64N por um cristal ZnSe. Foram feitas 2 réplicas de cada grupo de membranas (AQ, B, H, BH). No capítulo 4 apenas se mostra o espectro de uma das amostras, uma vez as réplicas são sobreponíveis.

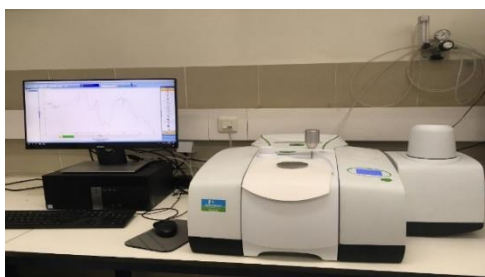


Figura 3.8 Espectrómetro utilizado no trabalho.

3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV)

Esta técnica é essencial para analisar a morfologia (microestrutura) nos vários grupos em estudo das membranas. Esta prática usa um feixe focalizado de elétrons de alta energia para gerar uma variedade de sinais na superfície de amostras sólidas. Estes sinais, que derivam das interações elétrons-amostra, podem revelar informações sobre as amostras, incluindo morfologia externa (textura), composição química, estrutura cristalina e orientação dos materiais que compõem a amostra, mediante detetores adequados (Ayeche *et al.*, 2010).

Uma membrana de cada grupo (AQ, B, H, BH) foi analisada por MEV usando um microscópio *TESCAN VEGA3 SBH 162* operando a 20 kV, onde se recolheram dois tipos de imagens, superfície e secção, com ampliações de 50X, 100X, 250X, 500X e 1000X para cada amostra. Antes de serem visualizadas as amostras foram revestidas com uma liga de Pt/Au, a fim de se tornarem condutoras.

3.2.3. Porosidade pelo Método do Etanol

A distribuição de tamanho dos poros nas redes das membranas pode ser determinada com o auxílio do etanol. Cada membrana (AQ, BH, B e H) foi submergida numa proveta com um volume de etanol definido (V_1), e colocadas num excicador sob vácuo, por um período de cinco minutos, como mostra a Figura 3.12. O volume de etanol mais a membrana corresponde ao volume total após o vácuo (V_2). De seguida, retirou-se de cada proveta as membranas sendo assim possível determinar o volume residual (V_3).

$$\varepsilon = (V_1 - V_3)/(V_2 - V_3) \quad (1)$$

Esta metodologia foi realizada de acordo com (Wang *et al.*, 2016), em triplicado e obtido o valor médio para cada membrana.

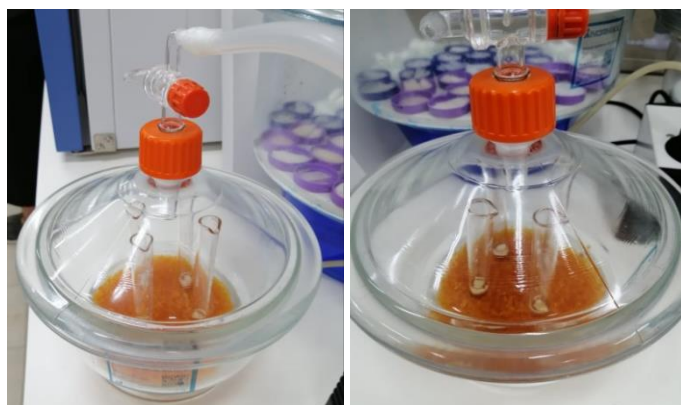


Figura 3.9 Amostras em etanol no dessecador de vácuo.

3.2.4. Teste de Degradação em Água Destilada

De forma a conhecer o perfil de degradação dos vários tipos de membranas, estas foram colocadas num gobelé com um volume de água e massa conhecida. Depois foi contabilizado o tempo que cada membrana, demorou a degradar e avaliado o seu comportamento durante esse tempo.

A membrana (*scaffold*) durante o período de implantação deverá ser biodegradado e substituído por novo tecido, de forma a fornecer uma base para o crescimento deste novo tecido. É importante que a taxa de degradação da membrana corresponda à taxa de regeneração do tecido. Além disso, as propriedades mecânicas devem ser preservadas durante a biodegradação para que as membranas possam permitir a proliferação celular e o transporte de nutrientes enquanto a regeneração óssea ocorre.

3.2.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica de análise térmica, que essencialmente avalia a variação (perda ou ganho) da massa da amostra, a partir da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma temperatura controlada, neste caso à temperatura corporal ($T=37^{\circ}\text{C}$). Possibilita conhecer as modificações que o aquecimento pode provocar na massa da amostra, e assim estabelecer a banda de temperatura em que as substâncias da amostra adquirem composição química fixa.

Este estudo foi realizado em duplicado para cada grupo de membranas (*AQ, B, H e BH*), no entanto, uma vez significativa, apenas uma membrana de cada tipo foi usada para apresentação do gráfico nos resultados.

O equipamento utilizado foi um *SDT Q500* da *Thermal Analysis (TA) Instruments*, com quantidades entre 5 a 10 mg de cada membrana. As membranas foram aquecidas até uma temperatura de 600°C , com uma velocidade de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em atmosfera de azoto com um fluxo de 100 mL/min.

3.2.6. Difração de Raios-X (DRX)

Para avaliação da cristalinidade e as fases características das membranas recorreu-se à difração de raio-X (DRX). Esta é das principais técnicas usadas para caracterizar materiais, uma vez que possui a capacidade de determinar as fases cristalinas presentes em materiais orgânicos ou inorgânicos (Kolassa *et al.*, 1979). Ao ser averiguada a composição e estrutura interna, pode-se assim confirmar a presença de compostos de fosfatos de cálcio, nanohidroxiapatite e β -TCP.

Os átomos cristalinos dos compostos fazem com que um feixe incidente de raios-X difracte em várias direções específicas. Quando um feixe incide sobre uma determinada família de planos com um ângulo θ , e é verificada a lei de Bragg - equação (1), esse feixe é difratado fazendo um ângulo 2θ com o feixe transmitido como é demonstrado na Figura 3.10. A radiação eletromagnética interage com a amostra em estudo com um comprimento de onda particular (λ) dependente da fonte, e possui um ângulo incidente orientado (θ), que atinge a amostra. A lei de Bragg relaciona 3 parâmetros: λ , d e θ . Para certos valores θ , a radiação incidente interfere construtivamente com planos paralelos definidos do cristal, com espaçamento interplanar (d) envolvendo a intensidade da radiação difratada (Gaspar, 2014).

$$\text{Lei de Bragg: } n \lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta \quad (2)$$

O n representado na equação expressa um número inteiro informativo da ordem de difração e o d_{hkl} um conjunto de planos cristalinos (representados por retas paralelas equidistantes de d - distância entre planos).

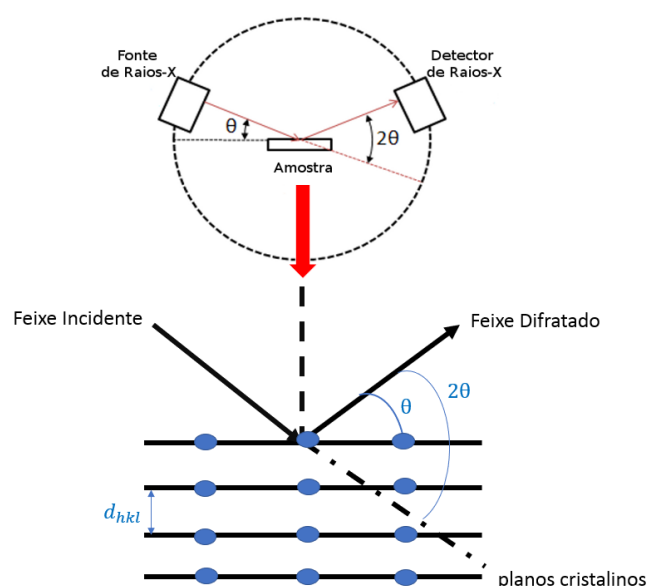


Figura 3.10 Representação esquemática do fenômeno da difração de Raio-X (Lei de Bragg).

Os planos de difração e as suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos (elétrões) ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância, permitindo assim a sua identificação. Ou seja, a partir da densidade dos elétrões as posições médias dos átomos no cristal podem ser determinadas, tal como as suas ligações químicas e várias outras informações (Culity & Stock, 2011).

No gráfico de difração cada pico é caracterizado por 3 elementos: posição, forma e intensidade. A posição está relacionada com a média de valores das distâncias d_{hkl} . A forma do pico é caracterizada pelo tamanho do grão dos cristais e defeitos dos mesmos. Por último, a intensidade é proporcional ao número de cristais dada pela condição de Lei de Bragg (Gaspar, 2014).

A largura a meia altura (FWHM) do pico de difração é resultante da convolução de 3 distintos efeitos: resolução instrumental, tamanho dos cristais e grau de tensão. A média do tamanho de grão de cristal (D) é determinada pela fórmula de Scherrer:

$$\beta = \frac{\varepsilon\lambda}{D \cos \theta} \quad (3)$$

O parâmetro β representa o FWHM do pico em termos de 2θ e é medido em radianos, λ é o comprimento de onda do feixe incidente do raio-X e ε é o fator de forma do grão dos cristais (usualmente é atribuído o valor de 0.9) (Gaspar, 2014).

O método usado foi o dos póis, aplicável a materiais policristalinos. Foi usada a geometria de *Bragg-Brentano* θ - 2θ com uma radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). A aquisição foi na gama 2θ de 10° a 90° com um passo de $0,03^\circ$ e um tempo de aquisição para cada passo de 1s. O difractor usado foi um *BRUKER 8D ADVANCE*.

3.2.7. Espectroscopia de Aniquilação de Positrões (EAP)

O positrão, e^+ , é a antipartícula do eletrão, possuindo a mesma massa, carga positiva e um spin $1/2$. O positrão pode ser produzido a partir de substâncias radioativas. Quando um núcleo radioativo decai, por decaimento β^+ , ocorre produção de um positrão. Ou pode formar-se através da produção de pares e^+e^- a partir de fótons gama de elevada energia com alta energia (por exemplo e^- de elevada energia que se fazem chocar contra materiais pesados, onde são emitidos raios gama devido ao processo de travagem (*Bremsstrahlung*) dos eletrões) (Luís, 2010).

O estudo da aniquilação do positrão em materiais tem trazido vantagens no mundo científico, na medida em que este pode oferecer várias informações sobre as propriedades estruturais do material. O tempo de vida dos positrões informa sobre a densidade eletrónica da matéria, e em caso de formação de *Ps* (positrónio), o seu tempo de vida ainda informa sobre a distribuição de volume livre do material (Luís, 2010). Estas características são benéficas na interpretação de análises de materiais porosos, uma vez que pode saber-se o grau de porosidade e tamanho dos volumes livres (poros) do material em estudo.

O e^+ e e^- quando se encontram aniquilam-se. Sob certas condições, podem também formar um estado ligado antes de ocorrer a aniquilação. A formação deste estado é denominada por positrónio (*Ps*). O *Ps* é um átomo excitado caracterizado pela união do eletrão e positrão. A formação deste ocorre frequentemente em gases, polímeros e líquidos. Em contacto com materiais, o *Ps* tende a localizar-se em locais com défice de eletrões, como poros e cavidades. O *Ps* pode existir em dois estados de spin: *p-Ps* ou *o-Ps*. O *o-Ps* é um estado de tripleto com um tempo de vida (142 ns em vácuo). Na matéria o *o-Ps* tem um tempo de vida que depende do ambiente dos materiais moleculares, proporcionando assim informações sobre os volumes vazios desses materiais. As colisões do *o-Ps* com átomos

podem resultar na aniquilação do positrão do *Ps* com um eletrão do meio envolvente, denominando-se por *pickoff*. O *pickoff* é proporcional ao número de choques com as paredes do espaço vazio, ou seja, num volume livre de pequena dimensão, existe maior número de choques, havendo maior probabilidade de aniquilação do o-*Ps* (Luís, 2010; Sharma *et al.*, 2013).

O tempo de vida do positrão vai desde a sua formação até à sua aniquilação, podendo ser estudada através do sistema PALS (*Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy*) observado na Figura 3.12. O princípio básico deste sistema é medir o tempo de vida individual dos e^+ registando os sinais, desde a sua produção até à sua eventual aniquilação com os e^- do meio envolvente. Estes dois eventos são registados usando cintiladores de raios gama. A fonte radioativa usada neste trabalho foi o ^{22}Na , que possui um decaimento β de 90%, sendo a emissão do e^+ seguida pela emissão de um fóton gama com energia 1,274 MeV. É possível ver o comportamento do decaimento desta fonte radioativa pela Figura 3.11. Este fóton assinala assim o nascimento do e^+ (iniciando a contagem temporal). Já os fótons gama originados pela aniquilação com 511 MeV são registados por outro cintilador, que interrompe a contagem temporal (Luís, 2010).

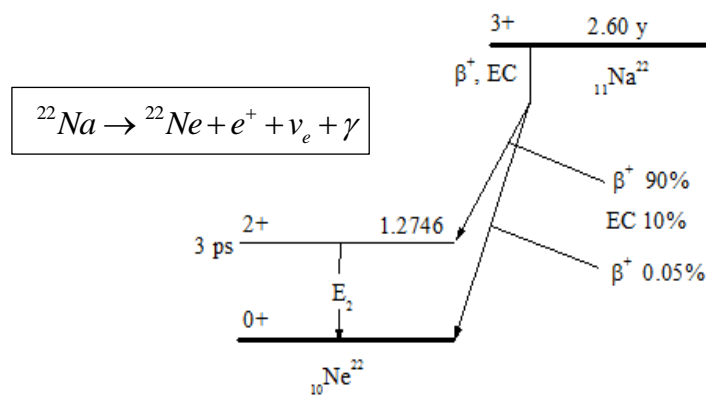


Figura 3.11 Esquema do decaimento do isótopo ^{22}Na .

O sistema PALS necessita assim de uma fonte radioativa, dois detetores de radiação gama, dois discriminadores de fração constante, um conversor analógico tempo/amplitude (TAC), outro conversor analógico/digital (ADC) e um analisador multicanal (MCA). E para além disto, é preciso um programa informático para fornecer a análise dos espectros de tempo de vida (LIT – *LifeTime*).

Na análise dos espectros é possível observar três componentes (Luís, 2010):

- Componente do tempo de vida menos curto do p-*Ps* (τ_1);
- Componente intermédia às aniquilações do e^+ livre (τ_2);
- Componente mais longa associada ao o-*Ps* (τ_3), estando esta associada à dimensão do volume livre onde o *Ps* é capturado.

No entanto também é possível o aparecimento de outras componentes (τ_3, τ_4 etc), às quais estão associadas aos diferentes volumes livres das cavidades do material em análise. Com o conhecimento do valor τ_3 , pode-se obter o raio (R) do volume livre da cavidade/poro, a partir do modelo simples de *Tao-Eldrup* (Shpotyuk *et al.*, 2016):

$$\tau_3 = \frac{1}{2} \left[1 - \frac{R}{R + \Delta R} + \frac{1}{2\pi} \sin \left(\frac{2\pi R}{R + \Delta R} \right) \right]^{-1} \quad (4)$$

O parâmetro ΔR representa a espessura da penetração da função de onda do *o*-Ps nas paredes do volume livre esférico. Normalmente, em polímeros esta espessura é: $\Delta R = R_0 - R = 1,66 \text{ \AA}$. Ao saber-se o raio da cavidade, pode facilmente ser calculado o volume livre da cavidade do polímero (através da rotina em Matlab – ANEXO D):

$$\text{Volume livre do poro} = \frac{4}{3} \pi R^3 \quad (5)$$



Figura 3.12 Sistema PALS experimental utilizado

Capítulo 4. Análise e Discussão de Resultados

4.1. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR)

Foram obtidos dois espectros de FTIR de cada grupo de membranas, e desses dois apenas um é apresentado, visto serem sobreponíveis. Na Figura 4.1 encontram-se os espectros obtidos dos polímeros de alginato de sódio e quitosano e da membrana polimérica AQ, enquanto que na Figura 4.2 são apresentados os espectros das distintas membranas. No ANEXO B pode observar-se os espectros de cada reagente individualmente, com os seus picos característicos identificados.

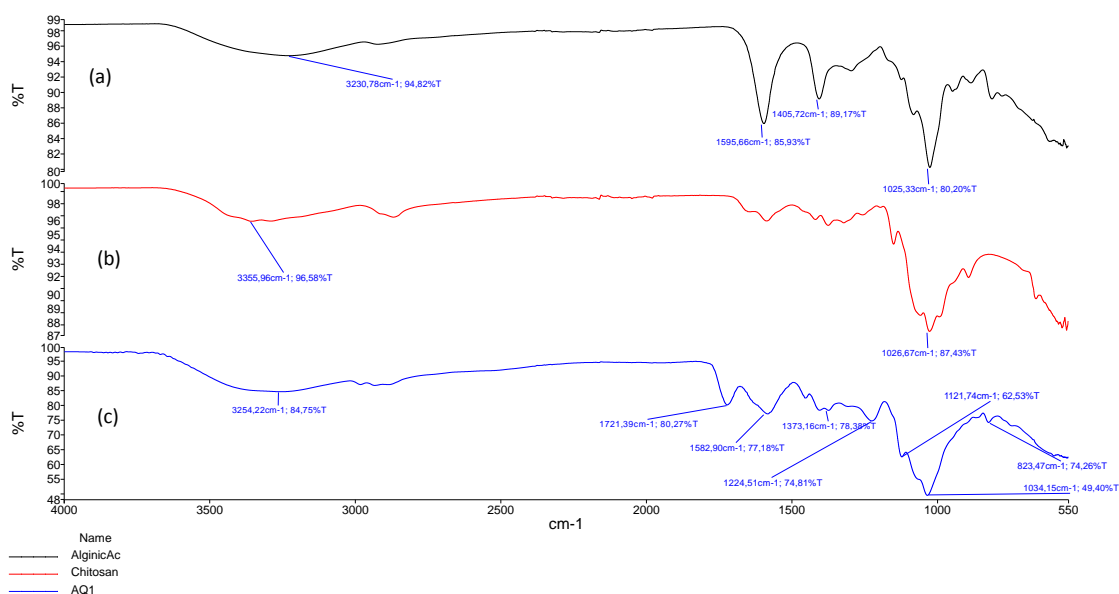


Figura 4.1 Espectros FTIR dos reagentes (a) alginato de sódio (b) quitosano e (c) membrana AQ1.

De forma a ser mais claro e para comparação com a membrana AQ, foram sistematizados na Tabela 4.1 e Tabela 4.2 os grupos funcionais do polímero de alginato de sódio e quitosano, respetivamente, referentes ao comprimento de onda dos picos assinalados na Figura 4.1 (a) e (b).

Tabela 4.1 Picos (cm^{-1}) de absorção referentes ao espectro de FTIR do polímero de alginato de sódio na Figura 4.1 (a) (Liao *et al.*, 2018; Daemi & Barikani, 2012; Kulig *et al.*, 2016).

Grupo Funcional	Comprimento de onda (cm^{-1})
Alongamento vibracional <i>OH</i>	3500-3000
Alongamento <i>C – H</i>	2919
Alongamento assimétrico <i>COO⁻</i>	1595
Alongamento simétrico <i>COO⁻</i>	1405
Alongamento vibracional <i>C – O</i>	1296 e 1025
Alongamento vibracional <i>C – C</i>	1081

Tabela 4.2 Picos de absorção (cm^{-1}) referentes ao espectro de FTIR do polímero de quitosano da Figura 4.1 (b) (Queiroz *et al.*, 2015; Kulig *et al.*, 2016; Nazeer *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2018).

Grupo Funcional	Comprimento de onda (cm^{-1})
Alongamento <i>NH</i> (amida I)	3300-3200
Alongamento vibracional <i>OH</i>	3255
Alongamento vibracional simétrico e assimétrico <i>CH₂</i>	2866, 1416, 1379 e 1428
Alongamento <i>C = O</i> (amida I)	1652
Dobramento <i>NH</i> (amida II)	1584
Alongamento <i>C – N</i> (amida III)	1326
Alongamento assimétrico <i>O – C – O</i>	1148
Alongamento vibracional <i>C – O</i>	1061 e 1026

No espectro da membrana AQ (Figura 4.1 (c) – traço azul) podem-se observar mudanças no posicionamento de algumas bandas, e aparecimento ou desaparecimento de picos aquando comparados com os espectros de alginato de sódio e quitosano individualmente devido à interação dos polímeros quando carregados opostamente. Este espectro apresenta uma banda a $3500 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ mais intensa do que nos polímeros individualmente, que é justificada pela formação de novas ligações hidrogénio entre os grupos $-OH$ e $-NH_2$ do quitosano e os grupos $-C = O$ e $-OH$ do alginato de sódio. O aparecimento do pico a 1721 cm^{-1} é associado ao estiramento dos grupos $-COO$, confirmando assim o aparecimento do complexo polieletrólito e da reticulação (Kulig *et al.*, 2016). Neste espectro já não é possível visualizar o pico intenso da primeira amina (encontrado a 1652 cm^{-1}), uma razão é a provável sobreposição com a banda da ligação imina produzida pela reticulação do

gloxal com o quitosano (Yang *et al.*, 2005). A reticulação é caracterizada pela presença de ligações imina ($C = N$) formadas a partir dos grupos $-NH_2$ do quitosano e com os grupos $-C = O$ do glixal. Porém, o glixal também pode reagir com os grupos $-OH$ do quitosano, mas não foi possível observar esse pico característico ($\sim 1100\text{ cm}^{-1}$) (Yang *et al.*, 2005), pois pode estar sobreposto com o alongamento antissimétrico $O-C-O$ particular nos polissacarídeos. É de recordar que a estrutura de quitosano apresenta dois grupos hidroxilo e um grupo amina, enquanto que a molécula de glixal apresenta dois grupos carbonilo, por isso existe assim duas formas de reticulação - como é descrito na Figura 2.24 – Capítulo 2, subcapítulo 2.2.5.1. Neste espectro o pico a 1582 cm^{-1} pertence à amida II aparece muito mais intenso comparativamente com o espectro de quitosano puro, devido à presença do alginato de sódio. Estas mudanças confirmam assim a formação de uma interação forte entre os grupos carboxílicos carregados negativamente do alginato de sódio com os grupos amina carregados positivamente do quitosano e da existência da reticulação.

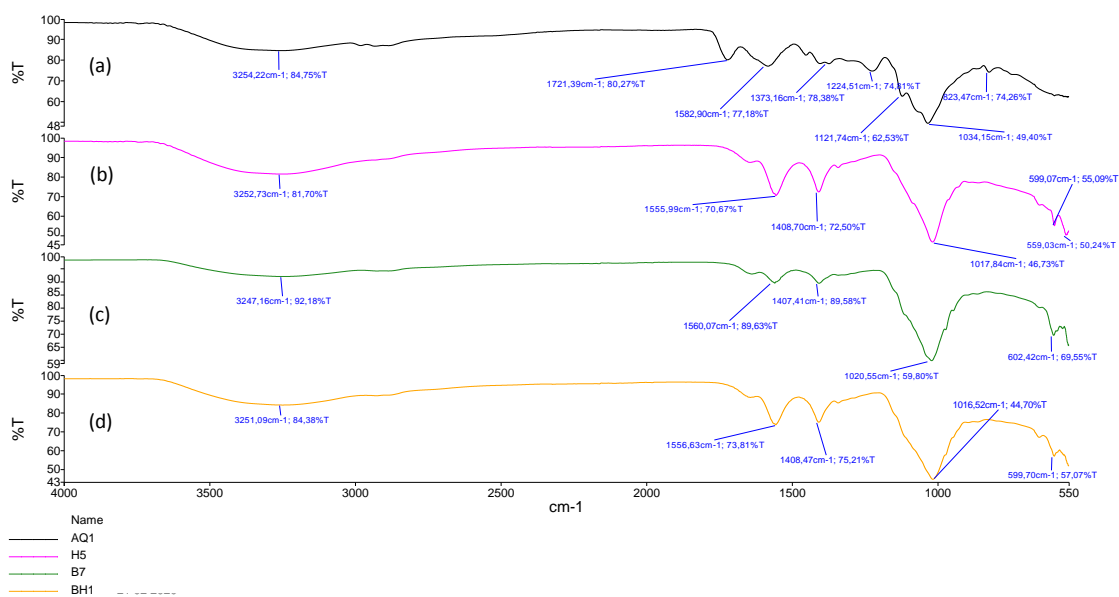


Figura 4.2 Espectros FTIR das membranas (a) AQ, (b) H, (c) B e (d) BH.

Em todas as membranas representadas na Figura 4.2 é possível observar a banda $3300-3200\text{ cm}^{-1}$ caracterizada pelo estiramento vibracional $O-H$. Nas membranas compósitas comparativamente à membrana polimérica é possível observar diferenças nos espectros, devido à a adição dos fosfatos de cálcio.

Na membrana com hidroxiapatite (H) (Figura 4.2 (b) – traço voileta) os picos apresentados a 559 cm^{-1} e 599 cm^{-1} , são atribuídos ao desdobramento das vibrações PO_4^{3-} . As bandas a 1408 cm^{-1} e 1555 cm^{-1} correspondem ao alongamento simétrico e assimétrico do COO^- do alginato de sódio (Liao *et al.*, 2018). A 1017 cm^{-1} ocorre o alongamento do $C-O$ característico dos polissacarídeos. Também, um pequeno pico a 1300 cm^{-1} é detetado devido à interação dos grupos PO_4^{3-} com os grupos $O-C-O$ dos polímeros (Bi *et al.*, 2019). Comparativamente, o espectro da membrana B com β -TCP (Figura 4.2 (c) – traço verde), apresenta picos menos intensos na região $1590-1400\text{ cm}^{-1}$, no entanto é possível observar um pico a 1583 cm^{-1} relativo ao quitosano. Em ambos os espectros, surge um pico a 1020 cm^{-1} devido ao estiramento característico dos

polissacarídeos. Os picos pertencentes ao β -TCP surgem a 943 cm^{-1} e 601 cm^{-1} , representando os picos de vibração PO_4^{3-} do mesmo (Mehdikhani & Borhani, 2014; Ebrahimi *et al.*, 2017; Xidaki *et al.*, 2018), que também aparecem na Figura 4.2 (c).

Na membrana *BH* (Figura 4.2 (d) – traço alaranjado) com formulação 70:30 de fosfatos de cálcio, β -TCP e hidroxiapatite, respetivamente, pode-se observar a sua semelhança aos espectros das membranas *B* e *H*. Verifica-se o pico característico do dobramento $O - P - O$ da HAp a 599 cm^{-1} e bandas de absorção a $600-610\text{ cm}^{-1}$ e $550-570\text{ cm}^{-1}$ do grupo PO_4^{3-} particular destes materiais inorgânicos. Para além disso, também se observa o pico de absorção $C - O$ e os picos de alongamento simétrico e assimétrico do alginato de sódio, a 1556 cm^{-1} e 1408 cm^{-1} respetivamente.

4.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV)

Como dito anteriormente foram recolhidas imagens com ampliações 100x, 250x, 500x e 1000x de cada plano (secção e superfície). No entanto, apenas as imagens com 250x foram escolhidas devido ao seu detalhe e melhor nitidez. Nas Figura 4.3 e 4.4 são visíveis os resultados.

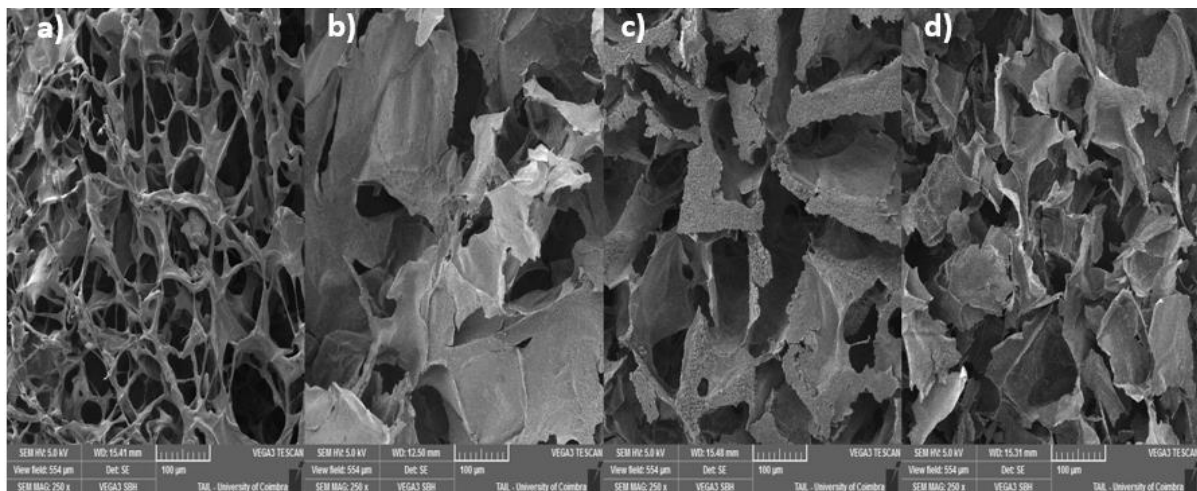


Figura 4.3 Imagens recolhidas por MEV da superfície da cada membrana com 250x: a) AQ (alginato de sódio-quitosano); b) *B* (alginato de sódio-quitosano & β -TCP); c) *BH* (alginato de sódio-quitosano & hidroxiapatite e β -TCP); d) *H* (alginato de sódio-quitosano & hidroxiapatite).

Nesta análise é possível examinar a topografia da superfície e secção das membranas (compósitas – *B*, *BH* e *H* e polimérica – AQ), de modo que é suscetível aferir a presença de poros de diferentes tamanhos: macroporosidade ($>50\text{ }\mu\text{m}$), mesoporosidade ($2-50\text{ }\mu\text{m}$) e microporosidade ($<2\text{ }\mu\text{m}$) (Fook *et al.*, 2010).

Nas imagens pode-se observar que as membranas de alginato de sódio e quitosano (AQ) têm inúmeros poros circulares definidos e interconectados com tamanho entre $5-150\text{ }\mu\text{m}$. Também é possível notar que que nesta membrana polimérica existe poros de menor dimensão quando comparada com as membranas compósitas, a justificação para este facto

poderá estar relacionada com a reticulação. Uma vez que no caso das membranas poliméricas o agente reticulante, glicolal, foi adicionado sem que houvesse a interferência dos CaP, levando à formação de ligações químicas entre as cadeiras dos polímeros (alginate de sódio e quitosano), aproximando-os e tornando assim a estrutura da membrana polimérica mais compacta com a presença de poros de menor dimensão. No entanto, isto já não é verificado nas membranas compósitas, já não estão presentes tantos poros de menores dimensões, devido ao facto dos fosfatos de cálcio dificultarem o acesso aos grupos dos polímeros, aquando da interação do glicolal, originando uma estrutura menos compacta. Logo, é de grande importância salientar a ordem em que os materiais foram adicionados durante o procedimento, uma vez influenciar a formação de poros nas membranas, e consequentemente, o grau de reticulação das membranas.

Apesar das membranas com fosfatos de cálcio (*BH*, *H* e *B*) apresentarem menor quantidade de poros comparativamente com as membranas *AQ*, a interconetividade continua presente entre os poros. Os poros dos materiais compósitos são mais irregulares e com uma distribuição mais heterogénea, a dimensão dos seus poros varia entre 5-200 μm , o que está concordante com estudos já realizados (Teng *et al.*, 2009; Kucharska *et al.*, 2012; Bi *et al.*, 2019). Para além disto, é possível observar nas membranas estruturas bem compostas devido à boa miscibilidade entre os grupos Ca^{2+} dos fosfatos de cálcio (nanohidroxiapatite e β -TCP) e o grupo NH_2 do quitosano (Teng *et al.*, 2009) e devido às fortes ligações electroestáticas e/ou interações de hidrogénio entre o Ca^{2+} e o COO^- do alginate de sódio (Rajkumar *et al.*, 2011).

Estudos relatam que com o aumento da adição de fosfatos de cálcio, nomeadamente a nanohidroxiapatite, até um certo valor, muitos poros podem colapsar, daí este tipo de membranas apresentarem menor quantidade de poros. A diminuição de porosidade nas membranas com fosfatos de cálcio, leva a um aumento da densidade dos poros (Jin *et al.*, 2012), o que influencia a formação da camada de apatite nas membranas. Estas partículas dissolvem-se em meio fisiológico, aumentando a concentração de iões de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que se vão depositando sob a superfície das membranas, e por sua vez favorecer a formação da camada de apatite (Zhang & Zhang, 2001).

Todas as membranas têm o requisito mínimo de possuírem poros com 100 μm de diâmetro (Wongwitwichot *et al.*, 2014). Este tamanho é o tamanho base para haver crescimento e regeneração de tecido ósseo (Dorozhkin, 2010), também são observados poros com 40-100 μm que suportam crescimento de matriz osteóide. O tamanho dos poros é fulcral, visto fornecerem um ambiente favorável aos materiais bioativos para poderem revelar as suas capacidades osteoindutoras e osteocondutoras. A presença de poros com dimensões >100 μm (macroporos) sustenta a ocupação de osteoblastos para a osteocondução, pois apresentam uma área de 700 μm^2 . Os poros com dimensões próximas de 5 μm também são visíveis, estes podem ajudar na migração iónica que ocorre entre o plasma sanguíneo e a superfície do implante (Fook *et al.*, 2010). Já nas membranas compósitas (*BH*, *B* e *H*) este fator ajuda na dissolução dos fosfatos de cálcio. Esta microporosidade também tem um papel significativo, visto aumentar a osteoindução nas membranas, promovendo funções osteogénicas das células e neoformação óssea. A presença da microporosidade pode aumentar significativamente a área de superfície específica e melhorar a permeabilidade das membranas, proporcionando assim mais locais de adsorção de proteínas com recetores de membrana relacionadas com funções osteogénicas (adesão, proliferação, diferenciação e biomineralização). Também é relatado na literatura, como referido anteriormente, que a microporosidade aumenta também a taxa de degradação das estruturas das membranas, e nomeadamente as estruturas à base de fosfatos de cálcio, como as membranas *BH*, *H* e *B* podem beneficiar deste fator, visto acelerarem a degradação destas membranas, a fim da camada de apatite se formar mais rapidamente (Zhang *et al.*, 2018).

Ambas as imagens dos planos, secção e superfície, demonstram ter poros interconectados e com dimensões que são fundamentais para a adesão celular e diferenciação celular. Também fornecem uma elevada porosidade que permite a infiltração celular e colonização da matriz extracelular (Davison *et al.*, 2014).

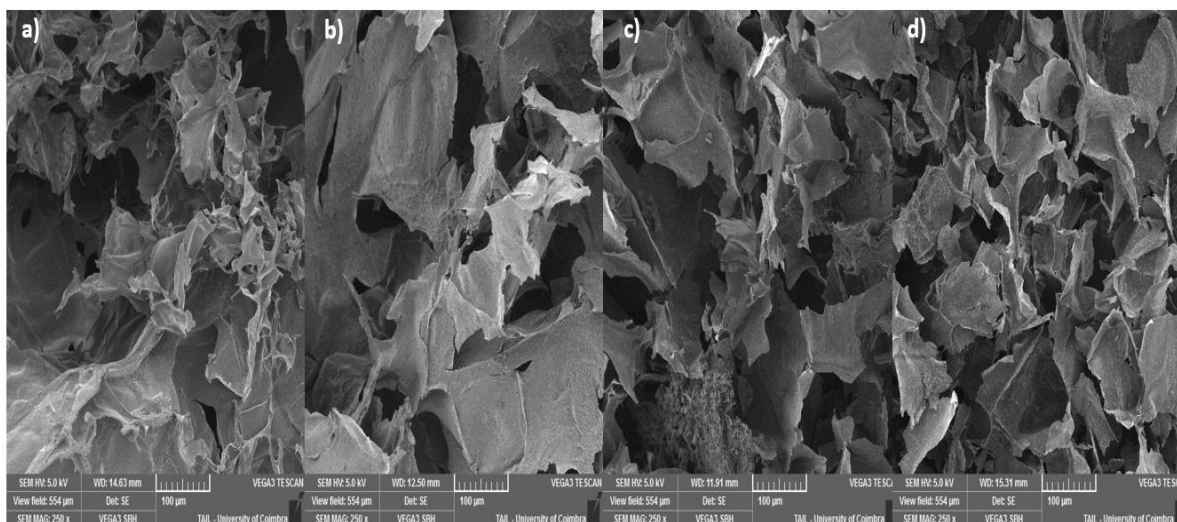


Figura 4.4 Imagens recolhidas por MEV da secção da cada membrana com 250x: a) AQ (alginato de sódio-quitosano); b) B (alginato de sódio-quitosano & β -TCP); c) BH (alginato de sódio-quitosano & hidroxiapatite e β -TCP); d) H (alginato de sódio-quitosano & hidroxiapatite).

4.3. Determinação da Porosidade pelo Método do Etanol

Para a determinação da porosidade pelo método do etanol, o volume de etanol colocado na proveta ($V1 = 3$ mL) necessita de ser conhecido para se poder proceder aos cálculos. Usando a fórmula (1) – Capítulo 3, subcapítulo 3.2.3 - pôde-se tomar conhecimento do valor da porosidade (ϵ) de cada grupo de membrana (*H*, *BH*, *AQ* e *B*).

A Tabela 4.3 mostra os resultados obtidos para cada membrana. Os cálculos da média da porosidade para cada grupo e respetivos desvios padrões, encontram-se no ANEXO E.

Tabela 4.3 Valor médio porosidade de cada membrana e respetivos desvios padrões.

Membrana	$\bar{\epsilon}$
<i>H</i>	0.70 (± 0.14)
<i>BH</i>	0.65 (± 0.09)
<i>AQ</i>	0.51 (± 0.18)
<i>B</i>	0.71 (± 0.07)

As membranas à base de fosfatos de cálcio são os que apresentam maior grau de porosidade, sendo que a membrana que apresenta maior grau de porosidade é membrana *B*, possuindo também o menor valor de desvio padrão. Durante o processo de recolha da porção de membrana imersa em etanol, as amostras com os fosfatos de cálcio (*B*, *H E* e *BH*) facilmente se desfaziam, o que tornaram a sua recolha mais complicada, enquanto a amostra *AQ* permaneceu constante durante a execução do procedimento.

O facto da membrana polimérica *AQ* apresentar menor porosidade vem corroborar com os resultados obtidos por MEV (Figura 4.3 e Figura 4.4), confirmando a sua estrutura porosa com poros de menores dimensões do que as membranas compósitas, devido ao maior grau de reticulação da membrana *AQ*.

4.4. Teste de Degradação em Água Destilada

Num gobelé com um volume de água destilada conhecido ($V = 3$ mL) foi colocado uma massa semelhante de cada grupo de membrana. Na Tabela 4.4 é apresentado o valor da massa de cada membrana antes da colocação em água.

Tabela 4.4 Tipo de membrana e respetivas massas iniciais.

Membrana	Massa (g)
<i>H</i>	0.0162 (± 0.0001)
<i>BH</i>	0.0166 (± 0.0003)
<i>AQ</i>	0.0161 (± 0.0002)
<i>B</i>	0.0164 (± 0.0001)

Após 20 dias, as amostras começaram a apresentar-se mais frágeis. A amostra *B*, *H* e *BH* mostraram ser as mais quebradiças, enquanto que a amostra *AQ* permaneceu mais constante ao longo deste tempo. Ao fim de 22 e 27 dias, a amostra *BH* e *B* acabaram por se desagregar completamente, respetivamente.

Passados 34 dias desagregou-se a amostra *H*, e após 37 dias a amostra *AQ*, sendo esta amostra a que manteve a sua estrutura durante mais tempo como é visível na Figura 4.5.

O processo de remodelação do osso tem uma duração superior a 100 dias, dos quais 90 dias servem para a formação de novo osso (Marie, 1992; Fuchs *et al.*, 2009), na qual as primeiras células de tecido regenerado a aparecer são: células indiferenciadas, plasmócitos, fibroblastos, linfócitos e macrófagos. Danielchenko *et al.* (2002), verificou a substituição completa de implante por tecido ósseo, em defeitos ósseos em ratinhos, após 24 dias de implantação. Tempo este, que está em concordância com este estudo de estabilidade em água destilada. Com a contribuição dos fosfatos de cálcio, as membranas podem auxiliar a ligação do implante ao osso mais facilmente, visto formarem uma camada de ligação entre

eles. A HAp é reabsorvida pelo osso mais lentamente que o β -TCP (Schimandle & Boden, 1997), e como estes resultados demonstram, a amostra *H* demorou mais tempo a degradar-se em água destilada do que a amostra *B*, sugere assim a sua boa contribuição na reabsorção óssea.

Nos resultados anteriores, de porosidade determinada pelo método de etanol, foi verificado uma menor porosidade na membrana AQ, devido à presença de poros de menor dimensão.

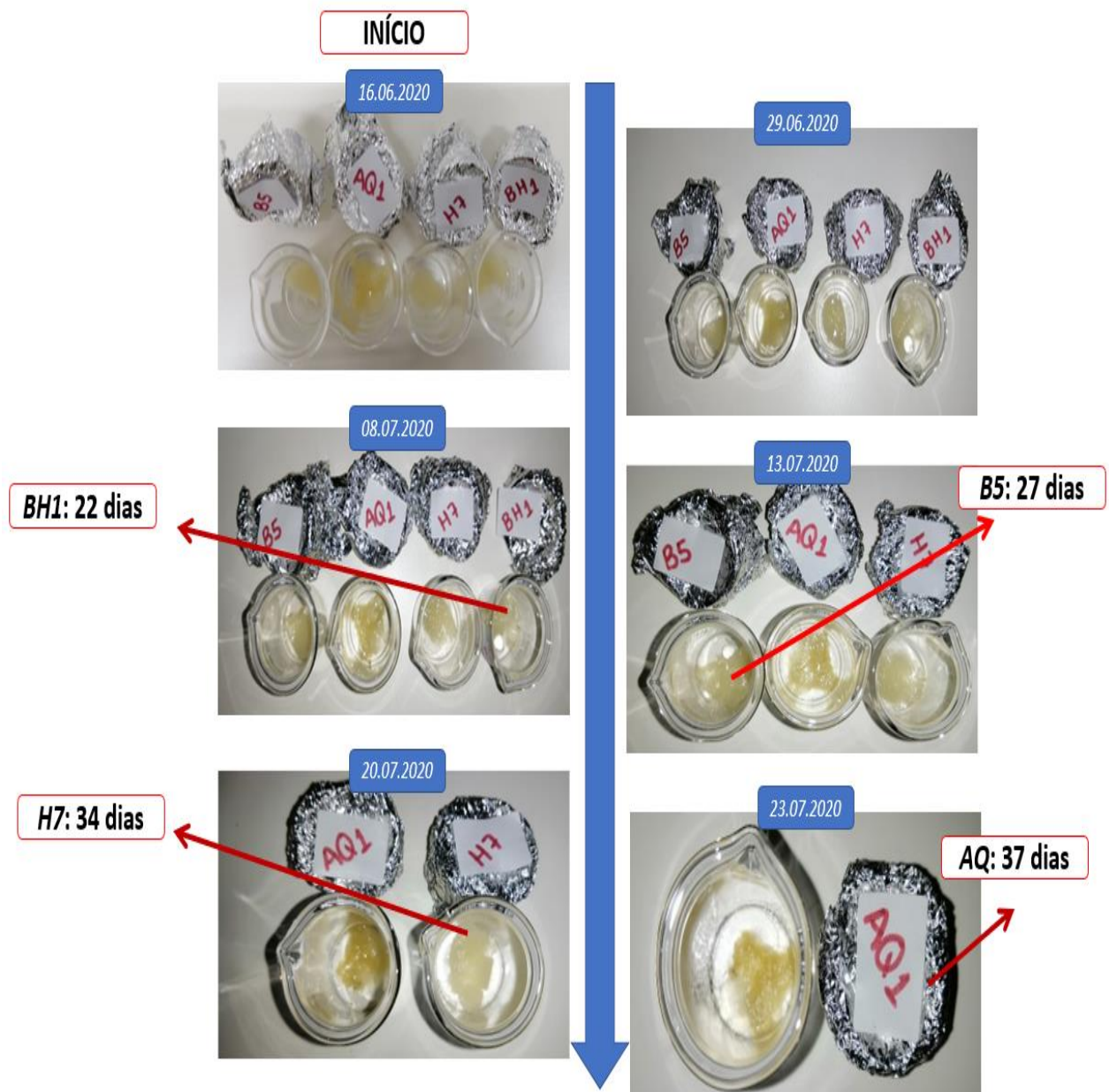


Figura 4.5 Esquema cronológico de cada grupo-teste.

4.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A perda de massa das membranas de cada grupo (AQ, BH, B e H) foi avaliada por TGA em duplicado, no entanto devido à concordância dos resultados de cada grupo, só apenas um é representado aqui (Figura 4.6).

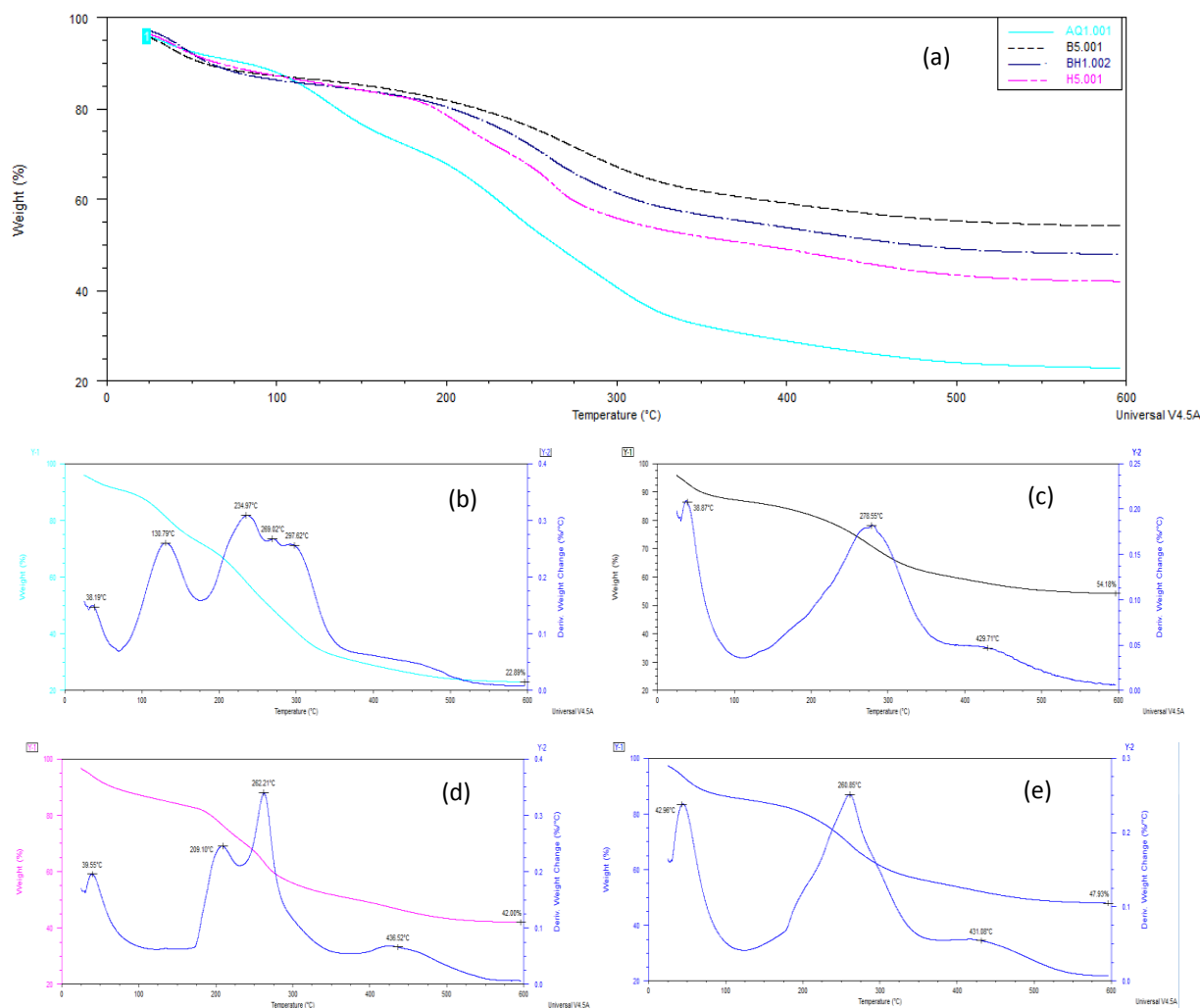


Figura 4.6 Curvas de TGA obtidas para as (a) membranas de AQ, BH, H e B; representação da derivada da perda de massa em função da temperatura das membranas (b) AQ, (c) B, (d) H e (e) BH.

De modo a facilitar a identificação das temperaturas de degradação das membranas (Tabela 4.5) recorreu-se à representação da derivada da massa perdida em função da temperatura, onde os pontos de inflexão representam o pico máximo. Para cada pico foi avaliada a massa perdida durante a decomposição térmica (Tabela 4.6). A partir da Figura 4.6 (a) pode-se averiguar uma maior taxa de degradação da membrana AQ (maior inclinação na curva) e mais rápida em relação às outras membranas (Nazeer *et al.*, 2017). Também é visto claramente que, no final do ensaio, as membranas compósitas apresentam maior resíduo aquando comparadas com a membrana polimérica (31.29% de diferença com a B, 25.05% com a BH e 19.11% com a H), o que é explicado pela presença dos materiais inorgânicos.

De acordo com a Figura 4.6, a membrana AQ ao longo da sua curva apresenta apenas dois estágios de degradação, enquanto que as restantes membranas BH, H e B apresentam três. O Estágio 1 referido na Tabela 4.5, ocorre entre a 38.19°C e 130.79°C - onde a primeira corresponde à evaporação da água que ficou retida durante o processo de liofilização; a segunda é caracterizada pela saída das moléculas livres de água que ficam retidas no complexo polimérico, uma vez que o quitosano e o alginato de sódio possuem dois grupos polares (amina, carboxílico respetivamente e ambos hidroxilo), que se podem ligar às moléculas de água (Kulig *et al.*, 2016). A existência de duas temperaturas referentes ao Estágio 1 não é verificada nas membranas compósitas, o que mais uma vez explica a existência de uma maior reticulação pelo glioxal nas cadeias poliméricas do alginato de sódio-quitosano, levando a uma maior dificuldade na saída de água nos poros de menores dimensões, registados nas imagens de MEV. Ambas as membranas compósitas apresentam menor perda de massa (~ 7%), enquanto a membrana polimérica perdeu 18.76%.

A partir do Estágio 2 (234.97°C) ocorre a degradação dos grupos funcionais dos polímeros, como o carboxílico e amina. Ocorre também a desacetilação e dispolimerização parcial da cadeia de quitosano e decomposição de matéria orgânica (Kulig *et al.*, 2016). Neste estágio ocorre a maior perda de massa da membrana AQ, perdendo no total 33.11% como citado na Tabela 4.6, enquanto que as membranas compósitas perdem menor quantidade 22.33%, 30.17% e 24.04% (B, H e BH, respetivamente). É possível verificar um outro pico a 297.62°C referente à decomposição do complexo eletrólito. Neste estágio, esta membrana foi a que necessitou de maior temperatura para rutura de ligações devido ao efeito da reticulação dois polímeros.

No Estágio 3, a partir dos 400°C, ocorre o processo de descarbonatação dos grupos CO_3^{2-} (Liao *et al.*, 1999). Concluindo que os polímeros de alginato de sódio e quitosano se desagregaram mais rapidamente na presença da nanohidroxiapatite quando comparada com o β -TCP. A razão para a perda contínua de massa durante o aquecimento, acima dos 500 °C, na membrana H pode ser devido à desidroxilação parcial da nanohidroxiapatite (Malla *et al.*, 2020).

É de referir também que todas as membranas AQ, BH, B e H se mantiveram estáveis à temperatura fisiológica corporal, com uma perda de massa total de 5.98%, 5.67%, 6.56% e 5.51%, respetivamente. No final do ensaio as membranas compósitas apresentaram maioritariamente resíduos de fosfatos de cálcio, visto ter havido degradação dos polímeros.

Resumindo, a percentagem de perda de massa total das quatro membranas segue a seguinte ordem:

$$B < BH < H < AQ$$

A partir dos resultados desta análise é possível verificar que a adição de biocerâmicos em membranas altera a taxa de degradação dos polímeros presentes na sua formulação, tornando-a mais lenta.

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANO
PARA APLICAÇÃO NA REGIÃO LOMBAR

Tabela 4.5 Temperaturas de decomposição térmicas (baseados nos estágios térmicos) das membranas *AQ*, *BH*, *H* e *B*.

Membrana	Estágio 1 (°C)	Estágio 2 (°C)	Estágio 3 (°C)
AQ	38.19 130.79	234.97 269.02 297.62	-
B	38.87	278.55	429.71
H	39.55	209.10 262.21	436.52
BH	42.96	260.85	481.08

Tabela 4.6 Percentagem de massa perdida ao longo dos picos e resíduo inicial/final de cada tipo de membrana em análise (*AQ*, *BH*, *H* e *B*).

Membrana	Massa Perdida no Estágio 1 (%)	Massa Perdida no Estágio 2 (%)	Massa Perdida no Estágio 3 (%)	Massa Inicial (mg)	Resíduo Final (mg)	Resíduo Final (%)
AQ	18.76	33.11	-	5.961	1.364	22.89
B	6.96	22.33	13.24	5.074	2.749	54.18
H	6.15	30.17	17.10	8.011	3.365	42.00
BH	6.65	24.04	17.85	9.013	4.320	47.93

4.6. Difração de Raios-X (DRX)

Com esta técnica foram analisadas uma membrana de cada grupo e os principais reagentes usados neste trabalho (alginato de sódio, quitosano, nHAp, β -TCP). Foi também analisada uma segunda membrana de um dos grupos, para controlo de reprodutibilidade. Os resultados obtidos foram os mesmos nas duas membranas do mesmo grupo.

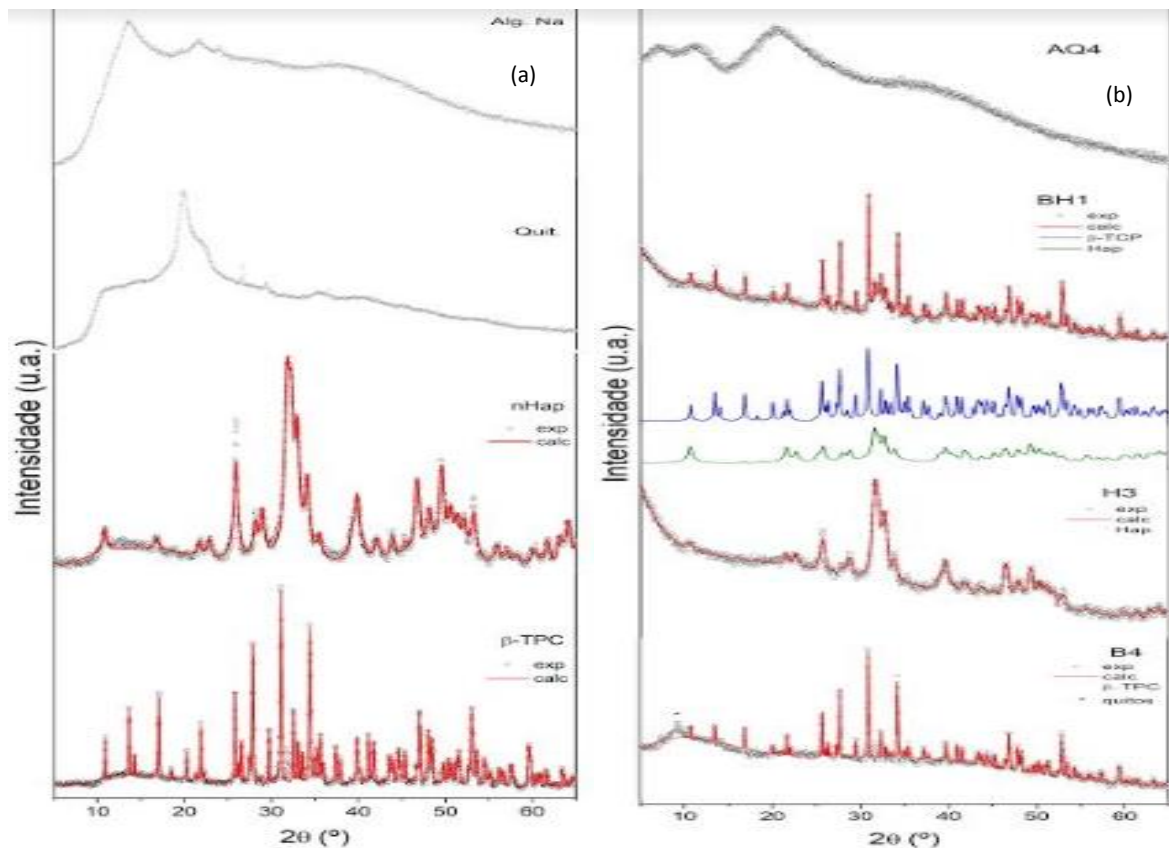


Figura 4.7 (a) DRX dos materiais usados para produção das membranas: alginato de sódio, quitosano, nHAP e β -TCP; (b) DRX das membranas em estudo: AQ, BH, B e H.

Na Figura 4.7 (a) apresentam-se os difratogramas dos reagentes. O alginato de sódio é semicristalino (Fu *et al.*, 2011; Parani, 2012). Os picos de difração característicos são para valores de $2\theta = 13.5^\circ$, 22° e 17° devido às reflexões da unidade poliguluronato, do polimanuronato e o último uma “bossa” amorfa (Fu *et al.*, 2011). Na amostra de quitosano observam-se diferentes morfismos (Hussain *et al.*, 2014): não-cristalino/amorfo e um pico cristalino a $2\theta = 20^\circ$ (Liao *et al.*, 2018; Chaudhary *et al.*, 2010). Habitualmente, os difratogramas do quitosano apresentam um “fingerprint” com picos a 10° e a 20° . A possibilidade de não se observarem mais picos cristalinos neste reagente tem a ver com o fato do parâmetro de cristalinidade depender do grau de desacetilação deste polímero como já referido em literatura. Quanto maior grau de desacetilação, maior cristalinidade (Yuan *et al.*, 2011), evento que é atribuído à maior flexibilidade das cadeias do quitosano e grupos acetil laterais mais amplos devido ao mau grau de desacetilação. Assim, os difratogramas deste polissacarídeo são versáteis, podendo abranger vários graus de desacetilação.

Para estes dois polímeros (alginato de sódio e quitosano) não foram encontradas fichas na base de dados JCPDF para uma análise comparativa entre valores teóricos e os valores experimentais obtidos.

Já nos difratogramas nanohidroxiapatite e β -fosfato tricálcico (Figura 4.7 (a)) foram ajustados os valores teóricos e aos valores experimentais para cada amostra, devido ao conhecimento da ficha técnica JCPDF de cada reagente. Numa visão geral é possível concluir que ambas as cerâmicas apresentam morfismo cristalino.

A nanohidroxiapatite (nHAp) pela sua ficha (PDF 00-64-0738) apresenta um grupo espacial hexagonal P63/m, com parâmetros de rede 9.4210 Å e 6.880 Å. Os resultados experimentais obtidos são semelhantes, com parâmetros de rede 9.4103 Å e 6.8733 Å e tamanho de cristalite 18,1 nm (obtida pela fórmula de *Shreer* – Capítulo 3, subcapítulo 3.2.2). Este tamanho de cristalite é pequeno, de acordo com o fato de termos a hidroxiapatite na escala nano. O β -TCP (PDF 09-0169) possui um grupo espacial rombo R-3c, com parâmetros de rede $a = 10.429$ Å e $c = 37.38$ Å. Estes valores foram também semelhantes com os resultados obtidos experimentalmente, $a = 10.4247$ Å e $c = 37.3954$ Å e tamanho de cristalite 212 nm.

Na Figura 4.7 (b) são representados os difratogramas das membranas desenvolvidas neste trabalho. Na membrana AQ (alginato de sódio-quitosano) é possível observar fases referentes de cada polímero. O pico ($2\theta = 20^\circ$) que antes foi observado no difratograma do quitosano puro, também foi visível na análise de DRX desta membrana. São visíveis duas regiões $2\theta = 5 - 15^\circ$, que não foram visíveis na amostra de alginato de sódio pura, mas estão referidas na literatura (Sundarrajan et al. 2012). A $35 - 40^\circ$ é possível visualizar outra região pertence ao alginato (Nair et al., 2020) quando comparada com a Figura 4.7 (a). No geral, esta membrana apresenta uma estrutura basicamente não cristalina.

As membranas compósitas (*BH*, *B* e *H*) constatarem de uma estrutura semi-cristalina, com regiões amorfas referentes aos polímeros e cristalinas referentes aos fosfatos de cálcio. Na membrana *H* (com apenas alginato de sódio-quitosano-nanohidroxiapatite) observa-se uma menor cristalização (Rajkumar et al., 2011), contudo os picos característicos da nHAp foram ajustados ao difratograma, obtendo-se um tamanho de cristalite de 25 nm. Para além disto, os picos característicos do alginato de sódio e quitosano não foram visíveis, podendo ser explicado pela baixa cristalinidade que é derivada pelas interações entre os três materiais. De $2\theta = 0 - 22^\circ$ é observada uma região amorfa, bem como a $2\theta = 45 - 55^\circ$, que é indicado em literatura (J. Liao et al., 2018). A amostra *B4* demonstra ser mais cristalina que a anterior, no entanto ainda é visível uma região amorfa $2\theta = 0 - 20^\circ$ referente ao alginato de sódio. São observáveis os picos característicos do β -TCP e ainda é possível identificar um pico característico do quitosano a 10° . O tamanho da cristalite obtido para o β -TCP foi de 256.7 nm.

O difratograma da amostra *BH* foi ajustado qualitativamente à hidroxiapatite e β -TCP. A membrana *BH* é composta por fosfatos de cálcio com uma proporção 70:30 de β -TCP e nHAp, respetivamente, e estes dois reagentes foram encontrados na análise DRX.

Com a análise do difratograma é possível concluir a ocorrência da formação de um novo composto, já mencionado na literatura (Wongwitwichot et al., 2014). A fase β -TCP apresenta um tamanho de cristalite de 171.7 nm e a nHAp apresenta 25.5 nm.

Pode-se concluir que o tamanho da cristalite diminuiu na membrana *BH* quando comparada com a membrana *B*. Já o tamanho da cristalite da nHAp manteve-se semelhante nas membranas *BH* e *H*. É importante referir que o osso humano apresenta um tamanho de cristalite ~ 20 nm (Danilchenko et al., 2002; Danilchenko et al., 2011), por isso é expectável que membranas com semelhantes tamanhos de cristalite ao osso sejam mais favoráveis na

reparação e regeneração osso. Assim, estes fosfatos podem auxiliar a ligação do implante ao osso humano, através da camada de apatite formada na superfície.

4.7. Espectroscopia de Aniquilação de Positrões

Primeiro, procedeu-se à verificação da configuração do sistema com uma amostra de referência de silício. O seu único tempo de vida é 218 ps, concordando com o valor tabelado, indicando assim que o sistema está bem definido. Com base neste dado, procedeu-se à análise dos tempos de vida de aniquilação do positrão de cada membrana, mas apenas é representado do espectro H na Figura 4.8 (AQ, BH, H e B).

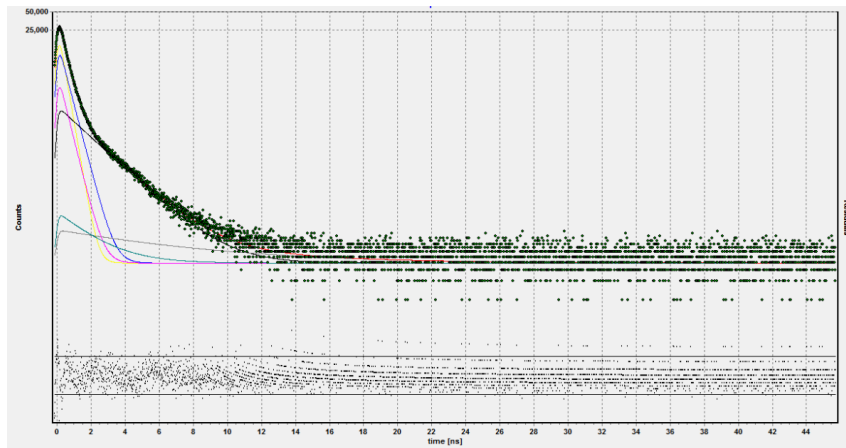


Figura 4.8 Espectro de tempo de vida do e^+ obtido da amostra H (como os espectros das restantes membranas eram semelhantes só se colocou desta amostra).

Existem vários tempos de vida como o τ_1 e o τ_2 (unidade temporal é o picossegundo), como dito no Capítulo 3 - subcapítulo 3.2.7, que estão associados à aniquilação do positrão com elétrons do meio, e outros tempos de vida como o τ_3 e τ_4 (unidade temporal é o nanossegundo), que resultam da aniquilação via *pick-off* do *o-Ps*. A informação τ_3 é a mais relevante para este trabalho, pois permite medir o volume livre (nanoporo) existente nas membranas. Contudo a componente τ_4 como apresenta muito pequena intensidade de formação não deve ser tomada em consideração. O valor da intensidade (I) representado na Tabela 4.7 é indicativo da percentagem de cada modo de decaimento.

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANO
PARA APLICAÇÃO NA REGIÃO LOMBAR

Tabela 4.7 Valores τ_1 , τ_2 , τ_3 e τ_4 , e respectivas intensidades para cada membrana em análise.

Membrana	τ_1 (ps)	I_1 (%)	τ_2 (ps)	I_2 (%)	τ_3 (ns)	I_3 (%)	τ_4 (ns)	I_4 (%)
B	286 (± 2)	59.9 (± 2)	510 (± 2)	28.5 (± 0.5)	1.85 (± 0.02)	11.3 (± 0.1)	5.3 (± 0.3)	0.3 (± 0.1)
BH	220 (± 1)	19.9 (± 0.5)	350 (± 1)	64.2 (± 0.5)	1.59 (± 0.02)	15.7 (± 0.1)	8.3 (± 0.4)	0.2 (± 0.1)
AQ	293 (± 3)	62.2 (± 1.2)	500 (± 2)	25.0 (± 0.5)	1.85 (± 0.02)	12.2 (± 0.1)	4.2 (± 0.2)	0.6 (± 0.2)
H	270 (± 2)	45.5 (± 1.1)	410 (± 2)	39.8 (± 0.5)	1.69 (± 0.02)	14.3 (± 0.1)	6.64 (± 0.3)	0.4 (± 0.3)

Tendo o valor τ_3 , pela equação (4) no Capítulo 3 – subcapítulo 3.2.7., pode-se calcular o raio (R) do volume livre na estrutura para cada membrana, e assim sabendo o raio, pode-se calcular o volume livre pela equação (5). De modo, a calcular o raio recorreu-se a uma pequena rotina em Matlab (ANEXO D), esta rotina pede a introdução do valor τ_3 (ns) e calcula o raio (R) associado a este em Å e o volume livre em Å³.

Tabela 4.8 Valor do volume livre associado ao raio (R) com ajuda da rotina de Matlab.

Membrana	Raio (nm)	τ_3 (ns)	Volume (nm ³)
B	0.271 (± 0.01)	1.85 (± 0.02)	0.083 (± 0.011)
BH	0.244 (± 0.01)	1.59 (± 0.02)	0.060 (± 0.012)
AQ	0.271 (± 0.01)	1.85 (± 0.02)	0.083 (± 0.011)
H	0.245 (± 0.01)	1.69 (± 0.02)	0.062 (± 0.010)

Pela análise da Tabela 4.8 é conclusivo que quanto maior τ_3 , maior raio. As membranas *B* e *AQ* são as que apresentam maior τ_3 (Anbinder *et al.*, 2016), de seguida a membrana *H* e por último a *BH*. As membranas apresentam volumes livres com tamanho nanométrico, definindo assim a sua nanoporosidade.

O volume livre desempenha um papel fundamental nas membranas para Engenharia de Tecidos: é necessário para a difusão de moléculas através dele, também está relacionado com as propriedades mecânicas destas estruturas e fenómenos de interface (Axpe *et al.*, 2015). É apresentado em literatura, que os nanoporos contribuem para osteoclastogénese, e o volume destes afeta predominantemente o grau de osteoclastogénese. Os osteoclastos podem promover a formação óssea por comunicação com células osteoblásticas. Neste processo, os osteoclastos irão recrutar os osteoblastos e promover a diferenciação osteogénica. O volume destes irá afetar a reabsorção da membrana e a osteogénese. Logo, uma existência destes é uma mais valia na regeneração de tecido ósseo (Hayashi & Ishikawa, 2020).

Capítulo 5. Discussão de Resultados

Os defeitos ósseos na coluna vertebral são um problema que tem crescido ao longo dos anos, afetando milhões de pessoas à escala mundial. Membranas reabsorvíveis são a escolha ideal para combater este problema. A escolha nos materiais e processo de fabrico são cruciais para o controlo físico-químico, biológico e propriedades mecânicas destas estruturas 3D. Neste trabalho foram obtidos 4 tipos de membrana: alginato de sódio-quitosano (AQ), alginato de sódio-quitosano & nHAp (*H*), alginato de sódio-quitosano & β -TCP (*B*) e alginato de sódio-quitosano & nHAp- β -TCP (*BH*).

Numa primeira fase os reagentes poliméricos, alginato de sódio e quitosano, foram dissolvidos com água destilada e ácido lácteo, respetivamente, como era descrito no protocolo inicial (Almeida, 2018). Contudo, quando estes eram combinados na etapa A, o alginato de sódio acabava por gelificar e não se misturava com o quitosano, de forma a formar um complexo polieletrólito e as membranas após liofilização apresentavam uma estrutura heterogénea. Posto isto, alterou-se o procedimento experimental e dissolveu-se ambos os reagentes poliméricos em ácido acético, tendo sido obtidas membranas mais homogéneas. Recorrendo à análise de FTIR, confirmou-se a presença de picos de absorção característicos quer da formação do complexo polieletrólito alginato de sódio-quitosano, quer da reticulação proporcionada pelo glioxal e ainda se verificou a presença de grupos fosfatos nas membranas compósitas.

Por DRX foi demonstrada a presença dos picos cristalinos característicos dos materiais usados nas membranas. Um ponto importante foi a semelhança do tamanho de cristalite da nHAp nas membranas *BH* e *H* com o tamanho de cristalite do osso humano, favorecendo a reparação e regeneração óssea.

Foi ainda verificada a influência da cristalinidade na degradação destas membranas. Membranas produzidas apenas com materiais poliméricos apresentam maior perda de massa e a uma taxa mais rápida comparativamente com membranas compósitas com materiais cristalinos (nHAp e β -TCP). Como se pode observar nos difratogramas (Figura 4.7 (b)), a membrana *B* consta de uma maior quantidade de picos cristalinos, e por sua vez foi a membrana que apresentou maior percentagem de resíduo final (54.18% - Tabela 4.6). Logo, salienta-se a importância de adicionar estes materiais inorgânicos às membranas, de modo a colmatar as falhas dos materiais poliméricos – a taxa de degradação – para que estes não se comecem a degradar logo aquando a implantação, de forma a apresentarem uma taxa de degradação compatível com a formação de novo osso.

Existe uma elevada porosidade nas membranas que é sustentada pelo método de porosidade de etanol (acima de 50% - Tabela 4.3), que é suscetível à adesão, proliferação e diferenciação celular, podendo dar origem a um tecido regenerado com melhor qualidade. A porosidade é um fator crucial na arquitetura de materiais biomédicos, um aumento da área superficial leva a uma redução de tempo de ligação entre o osso e o implante. As membranas, tanto o grupo com apenas polímeros como os grupos com fosfatos de cálcio, apresentam macroporosidade, mesoporosidade e microporosidade. A macroporosidade é revelada pelas imagens de MEV, onde se observam poros com 100 μ m e interconectados, atingindo assim o requisito mínimo para uma membrana. É importante que haja poros com estas dimensões, pois o crescimento de células ósseas ocorre em 100 - 200 μ m, além disto, a propriedade de osteocondução é revelada nestas dimensões também. Na adição de fosfatos de cálcio observa-se nas imagens (Figura 4.4 e Figura 4.5) uma diminuição na porosidade, os poros das membranas tornaram-se mais irregulares e as paredes destes poros mais densas. Estas mudanças podem ser explicadas devido ao fato das partículas CaP não só ficarem embebidas na matriz das membranas, mas sim também na sua superfície. Contudo, isto é um bom

indicador, visto os fosfatos de cálcio depositados nas paredes serem em meio fisiológico dissolvidos, a fim de formarem uma camada de apatite onde novo osso formar-se-á. A microporosidade é observada nas imagens de MEV poros de menores dimensões (Figura 4.4 e Figura 4.5). A microporosidade está relacionada com a osteoindução, facilitando a migração iônica que ocorre inicialmente entre o implante-plasma sanguíneo, que por sua vez influencia a dinâmica de adsorção celular, que podem contribuir na dissolução das cerâmicas em estudo. Em EAP são encontrados nanoporos, que são indicados como uma mais valia para a diferenciação osteogênica.

O efeito da reticulação também foi observado nas análises feitas nas membranas. Durante o processo de preparação, as membranas foram reticuladas com recurso ao glioxal, contudo, verificou-se que este processo não foi eficiente nas membranas compósitas, uma vez que, a adição do glioxal foi realizada após a adição dos fosfatos de cálcio, o que fez com que houvesse uma maior dificuldade em aceder às cadeias e reticulá-las. Isto foi aparente nas análises feitas em MEV, porosidade pelo método de etanol e degradação em água destilada. A reticulação entre os grupos funcionais faz com que haja uma aproximação das cadeias, diminuindo assim o volume livre e como foi demonstrado, a membrana AQ foi a que mostrou poros de menores dimensões. Este fator, por consequente, irá diminuir o acesso para a entrada de água e etanol, pelo que influenciou também a degradação hidrolítica, fazendo com que a membrana AQ apresentasse uma degradação mais lenta; e no método de etanol foi a membrana que deteve menor grau de porosidade.

Na Tabela 5.1 encontram-se sistematizada as características de cada membrana, pelo seu tamanho de poro e grau de porosidade.

Tabela 5.1 Sistematização do tamanho dos poros encontrados nos diferentes tipos de membrana e nível de porosidade (grau de observação (+)).

Membrana	Microporosidade	Mesoporosidade	Macroporosidade	Grau de Porosidade
B	+	++	+++	+++
BH	+	++	+++	++
AQ	+++	++	+	+
H	+	++	++	+++

Em suma, pode-se afirmar que os objetivos propostos do trabalho foram alcançados, tendo os resultados sido satisfatórios e concordantes entre as análises feitas e os reportados na literatura.

Capítulo 6. Conclusão

De um modo geral, todas as membranas preparadas apresentaram boas propriedades para a regeneração óssea. Neste trabalho foi avaliada a influência da presença de dois tipos de fosfatos de cálcio, bem como a sua mistura, numa matriz biopolimérica. Considerando os métodos de caracterização aqui estudados, verificou-se que a adição de fosfatos melhorou a estabilidade térmica das membranas e o grau de porosidade. Contudo, para as membranas compósitas verificou-se que apesar das diferenças entre os fosfatos (estrutura química e granulometria) não houve diferenças significativas de estrutura e comportamento entre eles. Mais ainda, a membrana *BH* formulada com os dois fosfatos de cálcio, não apresentou nenhum tipo de destaque aquando comparada com as outras membranas compósitas, apesar de estar relatado em vários artigos científicos que as propriedades da nanohidroxiapatite, como a degrabilidade e características de superfície, seriam melhoradas com a adição de uma fase secundária, de menor ponto de fusão, o β -TCP. Ainda assim, as membranas apresentaram um grau de porosidade adequada, com uma porosidade acima de 50% e é observável interconetividade entre poros, microporosidade, mesoporosidade e macroporosidade, que é fundamental para a mimetização do ambiente ósseo em Engenharia de Tecidos.

Apesar dos resultados satisfatórios e coerentes, é necessário ainda um estudo profundo do comportamento biológico das membranas (principalmente em contacto com células do osso); como também é fundamental analisar mecanicamente estas membranas devido à carga a que o osso está sujeito.

Capítulo 7. Trabalhos Futuros

Neste trabalho procurou-se desenvolver um substituo médico, de forma a contornar os problemas dos materiais convencionais usados para a fusão lombar posterior. A síntese de membranas para esse fim depende de vários parâmetros como os polímeros e os cerâmicos usados, entre outros. No decorrer deste trabalho foi possível observar que adição dos cerâmicos influenciaram as membranas, no entanto ainda são resultados preliminares e são necessários estudos sobre outros parâmetros a fim de se melhorar a eficiência destes na aplicação pretendida. De seguida encontram-se são referenciados alguns pontos importantes a considerar:

1. **Otimização da escolha dos materiais** base usados. É importante avaliar o **grau de pureza do polímero de quitosano** e comparar diferentes membranas com distintos graus de pureza, visto este fator influenciar a biocompatibilidade do polímero. Também seria interessante utilizar diferentes tipos de alginato, como o alginato de cálcio, que tem suscitado curiosidade em várias aplicações biomédicas;
2. Realização de **ensaios mecânicos** (tensão e compressão). As propriedades mecânicas de uma membrana para implantação no osso são cruciais, visto o osso necessitar de mais rigidez que outro tipo de tecido. O tamanho do poro e grau de porosidade são parâmetros que podem influenciar a resistência mecânica do biomaterial, comprometendo a sua integridade estrutural;
3. Avaliação da **biocompatibilidade** das membranas através de ensaios *in vitro* (teste de hemólise, cultura celular com células MG-63 e citotoxicidade com células osteoblásticas humanas hOB) e *in vivo*;
4. Incorporação de **fatores de crescimento** de forma a acelerar a regeneração óssea;
5. **Incorporação de um fármaco** (nomeadamente o *Vancomycin*) na matriz das membranas e **avaliação da sua libertação** em meio fisiológico. A revisão bibliográfica desta abordagem encontra-se no Anexo A;
6. Avaliação da **atividade antimicrobial** das membranas com bactérias *Staphylococcus aureas*. No campo cirúrgico as intervenções ortopédicas apresentam alto risco, desencadeando respostas inflamatórias devido à colonização bacteriana na superfície do biomaterial.

Referências Bibliográficas

- Ahmed, Shakeel, and Saiqa Ikram. 2016. "Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing." *Achievements in the Life Sciences* 10 (1): 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001>.
- Allo, Bedilu A., Daniel O. Costa, S. Jeffrey Dixon, Kibret Mequanint, and Amin S. Rizkalla. 2012. "Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration." *Journal of Functional Biomaterials* 3 (2): 432–63. <https://doi.org/10.3390/jfb3020432>.
- Almeida, V. (2018). *Desenvolvimento de Adesivos à Base de Quitosano e Fosfato de Cálcio para a Regeneração Óssea*. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra.
- Alvarenga, Elson Santiago de, Cristiane Pereira de Oliveira, and Carlos Roberto Bellato. 2010. "An Approach to Understanding the Deacetylation Degree of Chitosan." *Carbohydrate Polymers* 80 (4): 1155–60. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.037>.
- Anbinder, Pablo, Carlos Macchi, Javier Amalvy, and Alberto Somoza. 2016. "Chitosan-Graft-Poly(n-Butyl Acrylate) Copolymer: Synthesis and Characterization of a Natural/Synthetic Hybrid Material." *Carbohydrate Polymers* 145: 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.072>.
- Ansari, Mojtaba. 2019. "Bone Tissue Regeneration: Biology, Strategies and Interface Studies." *Progress in Biomaterials* 8 (4): 223–37. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>.
- Aranaz, Inmaculada, Enrique Martínez-Campos, Carolina Moreno-Vicente, Ana Civantos, Sara García-Arguelles, and Francisco del Monte. 2017. "Macroporous Calcium Phosphate/Chitosan Composites Prepared via Unidirectional Ice Segregation and Subsequent Freeze-Drying." *Materials* 10 (5): 1–14. <https://doi.org/10.3390/ma10050516>.
- Axpe, Eneko, Loic Bugnicourt, David Merida, Maite Goiriena-Goikoetxea, Iraultza Unzueta, Ruben Sanchez-Eugenia, Jose Angel Garcia, Fernando Plazaola, and Sonia Contera. 2015. "Sub-Nanoscale Free Volume and Local Elastic Modulus of Chitosan-Carbon Nanotube Biomimetic Nanocomposite Scaffold-Materials." *Journal of Materials Chemistry B* 3 (16): 3169–76. <https://doi.org/10.1039/c5tb00154d>.
- Azeredo, Henriette M.C., and Keith W. Waldron. 2016. "Crosslinking in Polysaccharide and Protein Films and Coatings for Food Contact - A Review." *Trends in Food Science and Technology* 52: 109–22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.008>.
- Azevedo, A. S., M. J.C. Sá, M. V.L. Fook, P. I.Nóbrega Neto, O. B. Sousa, S. S. Azevedo, M. W. Teixeira, F. S. Costa, and A. L. Araújo. 2014. "Use of Chitosan and β -Tricalcium Phosphate, Alone and in Combination, for Bone Healing in Rabbits." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 25 (2): 481–86. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5091-2>.
- Bagher, Zohreh, Farzad Rajaei, and Mohammadali Shokrgozar. 2012. "Comparative Study of Bone Repair Using Porous Hydroxyapatite/ β -Tricalcium Phosphate and Xenograft Scaffold in Rabbits with Tibia Defect." *Iranian Biomedical Journal* 16 (1): 18–24. <https://doi.org/10.6091/IBJ.996.2012>.
- Bakhsheshi-Rad, H. R. *et al.* Novel nanostructured baghdadite-vancomycin scaffolds: In-vitro drug release, antibacterial activity and biocompatibility. *Mater. Lett.* **209**, 369–372 (2017).
- Baran, Talat. 2016. "New Chitosan-Glyoxal Beads Supported Pd(II) Catalyst: Synthesis, Characterization and Application in Suzuki Coupling Reactions." *Hacetatepe Journal of Biology and Chemistry* 3 (44): 307–307. <https://doi.org/10.15671/hjbc.20164420573>.
- Baysal, Kemal, Ayse Z. Aroguz, Zelal Adiguzel, and Bahattin M. Baysal. 2013. "Chitosan/Alginate Crosslinked Hydrogels: Preparation, Characterization and Application for Cell Growth Purposes." *International Journal of Biological Macromolecules* 59: 342–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073>.

- Benson, Daniel R. 1991. "Disorders of the Lumbar Spine." *The Journal of Bone & Joint Surgery* 73 (8): 1278. <https://doi.org/10.2106/00004623-199173080-00029>.
- Bi, Yong guang, Zi ting Lin, and Shi ting Deng. 2019. "Fabrication and Characterization of Hydroxyapatite/Sodium Alginate/Chitosan Composite Microspheres for Drug Delivery and Bone Tissue Engineering." *Materials Science and Engineering C* 100 (February): 576–83. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.040>.
- Boden, Scott D. 2002. "Overview of the Biology of Lumbar Spine Fusion and Principles for Selecting a Bone Graft Substitute." *Spine* 27 (16 SUPPL.): 26–31. <https://doi.org/10.1097/00007632-200208151-00007>.
- Bow, Austin, David E. Anderson, and Madhu Dhar. 2019. "Commercially Available Bone Graft Substitutes: The Impact of Origin and Processing on Graft Functionality." *Drug Metabolism Reviews* 51 (4): 533–44. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1671860>.
- Bròdano, Giovanni Barbanti, Gianluca Giavaresi, Francesco Lolli, Francesca Salamanna, Annapaola Parrilli, Lucia Martini, Cristiana Griffoni, et al. 2014. "Hydroxyapatite-Based Biomaterials versus Autologous Bone Graft in Spinal Fusion: An in Vivo Animal Study." *Spine* 39 (11): E661–68. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000000311>.
- Chang, Jung Jhih, Yen Hsien Lee, Meng Hsiu Wu, Ming Chien Yang, and Chiang Ting Chien. 2012. "Electrospun Anti-Adhesion Barrier Made of Chitosan Alginate for Reducing Peritoneal Adhesions." *Carbohydrate Polymers* 88 (4): 1304–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.011>.
- Chatelet, Claire, Odile Damour, and Alain Domard. 2001. "Influence of the Degree of Acetylation on Some Biological Properties of Chitosan Films." *Biomaterials* 22 (3): 261–68. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00183-6).
- Chaudhary, Chetan, and Tarun Garg. 2015. "Scaffolds: A Novel Carrier and Potential Wound Healer." *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 32 (4): 277–321. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2015011246>.
- Chaudhary, D., M. R. Went, K. Nakagawa, S. J. Buckman, and J. P. Sullivan. 2010. "Molecular Pore Size Characterization within Chitosan Biopolymer Using Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy." *Materials Letters* 64 (23): 2635–37. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2010.08.045>.
- Chen, Ta Wei, Shwu Jen Chang, Gregory Cheng Chie Niu, Yun Ting Hsu, and Shyh Ming Kuo. 2006. "Alginate-Coated Chitosan Membrane for Guided Tissue Regeneration." *Journal of Applied Polymer Science* 102 (5): 4528–34. <https://doi.org/10.1002/app.24945>.
- Chen, Xi Guang, Li Zheng, Zhen Wang, Chang Yong Lee, and Hyun Jin Park. 2002. "Molecular Affinity and Permeability of Different Molecular Weight Chitosan Membranes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21): 5915–18. <https://doi.org/10.1021/jf020151g>.
- Cheng, T., Qu, H., Zhang, G. & Zhang, X. Osteogenic and antibacterial properties of vancomycin-laden mesoporous bioglass/PLGA composite scaffolds for bone regeneration in infected bone defects. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **46**, 1935–1947 (2018).
- Cheng, Xian, and Fang Yang. 2019. "More Than Just a Barrier—Challenges in the Development of Guided Bone Regeneration Membranes." *Matter* 1 (3): 558–60. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2019.08.009>.
- Coates, John. 2006. "Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach." *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–23. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5606>.
- Coimbra, P. et al. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **48**, 112–118 (2011).
- Costa, José Boaventura Zumaêta, Fabrício da Silva, Christiano de Almeida Dultra, Laís Farias Souza, and Maria Clara Nascimento Elyotte dos Santos. 2016. "O USO DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS - Uma Revisão de Literatura." *Revista Bahiana de Odontologia* 7 (1): 14–21.

- Costa, Marcia P.M., Letícia M. Prates, Leonardo Baptista, Maurício T.M. Cruz, and Ivana L.M. Ferreira. 2018. "Interaction of Polyelectrolyte Complex between Sodium Alginate and Chitosan Dimers with a Single Glyphosate Molecule: A DFT and NBO Study." *Carbohydrate Polymers* 198 (May): 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.052>.
- Daemi, H., and M. Barikani. 2012. "Synthesis and Characterization of Calcium Alginate Nanoparticles, Sodium Homopolymannuronate Salt and Its Calcium Nanoparticles." *Scientia Iranica* 19 (6): 2023–28. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2012.10.005>.
- Danilchenko, S. N., O. G. Kukhareno, C. Moseke, I. Yu Protsenko, L. F. Sukhodub, and B. Sulkio-Cleff. 2002. "Determination of the Bone Mineral Crystallite Size and Lattice Strain from Diffraction Line Broadening." *Crystal Research and Technology* 37 (11): 1234–40. [https://doi.org/10.1002/1521-4079\(200211\)37:11<1234::AID-CRAT1234>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-4079(200211)37:11<1234::AID-CRAT1234>3.0.CO;2-X).
- Danilchenko, Sergei N., Oksana V. Kalinkevich, Maksim V. Pogorelov, Aleksei N. Kalinkevich, Anatoly M. Sklyar, Tatyana G. Kalinichenko, Vyacheslav Y. Ilyashenko, et al. 2011. "Characterization and in Vivo Evaluation of Chitosan-Hydroxyapatite Bone Scaffolds Made by One Step Coprecipitation Method." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 96 A (4): 639–47. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33017>.
- Davison, Noel L., Florence Barrère-de Groot, and Dirk W. Grijpma. 2014. *Degradation of Biomaterials. Tissue Engineering: Second Edition*. Second Edi. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420145-3.00006-7>.
- Deng, Yi, Wei Zhong Yang, Dong Shi, Minjie Wu, Xiao Ling Xiong, Zhi Gang Chen, and Shi Cheng Wei. 2019. "Bioinspired and Osteopromotive Polydopamine Nanoparticle-Incorporated Fibrous Membranes for Robust Bone Regeneration." *NPG Asia Materials* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41427-019-0139-5>.
- Dimitriou, Rozalia, George I. Mataliotakis, Giorgio M. Calori, and Peter V. Giannoudis. 2012. "The Role of Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration and Restoration of Large Bone Defects: Current Experimental and Clinical Evidence." *BMC Medicine* 10 (July 2012). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-81>.
- Domb, A. & Mikos, A. G. Matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 185–186 (2007).
- Dorozhkin, Sergey V. 2010. "Bioceramics of Calcium Orthophosphates." *Biomaterials* 31 (7): 1465–85. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.050>.
- Du, L. et al. Scaffold composed of porous vancomycin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: A controlled-release drug delivery system with shape-memory effect. *Mater. Sci. Eng. C* **78**, 1172–1178 (2017).
- Duy, Phan Q., and William S. Anderson. 2018. "Two Surgeries Do Not Always Make a Right: Spinal Cord Stimulation for Failed Back Surgery Syndrome." *Yale Journal of Biology and Medicine* 91 (3): 323–31.
- Duygu, Dilek, Tülay Baykal, Ilkay Açikgöz, and Kazim Yildiz. 2009. "Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies." *Gazi University Journal of Science* 22 (3): 117–21.
- Ebrahimi, Mehdi, Michael G. Botelho, and Sergey V. Dorozhkin. 2017. "Biphasic Calcium Phosphates Bioceramics (HA/TCP): Concept, Physicochemical Properties and the Impact of Standardization of Study Protocols in Biomaterials Research." *Materials Science and Engineering C* 71 (November): 1293–1312. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.039>.
- Elgali, Ibrahim, Omar Omar, Christer Dahlin, and Peter Thomsen. 2017. "Guided Bone Regeneration: Materials and Biological Mechanisms Revisited." *European Journal of Oral Sciences* 125 (5): 315–37. <https://doi.org/10.1111/eos.12364>.
- Eltom, Abdalla, Gaoyan Zhong, and Ameen Muhammad. 2019. "Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review." *Advances in Materials Science and Engineering* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>.

- Epstein, Nancy. 2015. "Preliminary Study Showing Safety/Efficacy of Nanoss Bioactive versus Vitoss as Bone Graft Expanders for Lumbar Noninstrumented Fusions." *Surgical Neurology International* 6: S318–22. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.159380>.
- Epstein, Nancy E. 2009. "Beta Tricalcium Phosphate: Observation of Use in 100 Posterolateral Lumbar Instrumented Fusions." *Spine Journal* 9 (8): 630–38. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2009.04.007>.
- Feng, Xu. 2010. "Chemical and Biochemical Basis of Bone Cell." *NIH Public Access* 3 (2): 975–90. <https://doi.org/10.2174/187231309788166398.Chemical>.
- Florea, Denisa- Alexandra, and Ecaterina Andronescu. 2019. "Materials International," 2–12.
- Florjanski, Wojciech, Sylwia Orzeszek, Anna Olchow, Natalia Grychowska, Włodzimierz Wieckiewicz, Andrzej Malysa, Joanna Smardz, and Mieszko Wieckiewicz. 2019. "Modifications of Polymeric Membranes Used in Guided Tissue and Bone Regeneration." *Polymers* 11 (5): 1–11. <https://doi.org/10.3390/polym11050782>.
- Fook, A. C.B.M., A. H. Aparecida, and M. V.L. Fook. 2010. "Desenvolvimento de Biocerâmicas Porosas de Hidroxiapatita Para Utilização Como Scaffolds Para Regeneração Óssea." *Revista Materia* 15 (3): 392–99. <https://doi.org/10.1590/S1517-70762010000300001>.
- Fu, Shao, Ankur Thacker, Diana M. Sperger, Riccardo L. Boni, Ira S. Buckner, Sachin Velankar, Eric J. Munson, and Lawrence H. Block. 2011. "Relevance of Rheological Properties of Sodium Alginate in Solution to Calcium Alginate Gel Properties." *AAPS PharmSciTech* 12 (2): 453–60. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9587-0>.
- Fuchs, Robyn K., Stuart J. Warden, and Charles H. Turner. 2009. *Bone Anatomy, Physiology and Adaptation to Mechanical Loading. Bone Repair Biomaterials*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845696610.1.25>.
- Garin, Christophe, and Séverine Boutrand. 2016. "Natural Hydroxyapatite as a Bone Graft Extender for Posterolateral Spine Arthrodesis." *International Orthopaedics* 40 (9): 1875–82. <https://doi.org/10.1007/s00264-016-3140-4>.
- Gaspar, N. (setembro 2014). *Development of a Biodegradable Nanoprobe*. Tese de Mestrado em Engenharia Biomédica. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra.
- Gedam, Asha H., Prashil K. Narnaware, and Vrushali Kinikar. 2018. "Blended Composites of Chitosan: Adsorption Profile for Mitigation of Toxic Pb (II) Ions from Water." *Chitin-Chitosan - Myriad Functionalities in Science and Technology*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74790>.
- Gierszewska, Magdalena, Jadwiga Ostrowska-Czubenko, and Ewelina Chrzanowska. 2018. "PH-Responsive Chitosan/Alginate Polyelectrolyte Complex Membranes Reinforced by Tripolyphosphate." *European Polymer Journal* 101: 282–90. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.031>.
- Gomez, I. Jennifer, Blanca Arnaiz, Michele Cacioppo, Francesca Arcudi, and Maurizio Prato. 2018. "Nitrogen-Doped Carbon Nanodots for Bioimaging and Delivery of Paclitaxel." *Journal of Materials Chemistry B* 6 (35). <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>.
- Guarino, Vincenzo, Tania Caputo, Rosaria Altobelli, and Luigi Ambrosio. 2015. "Degradation Properties and Metabolic Activity of Alginate and Chitosan Polyelectrolytes for Drug Delivery and Tissue Engineering Applications." *A/MS Materials Science* 2 (4): 497–502. <https://doi.org/10.3934/materci.2015.4.497>.
- Gupta, Ashim, Nitin Kukkar, Kevin Sharif, Benjamin J. Main, Christine E. Albers, and Saadiq F. El-Amin. 2015. "Bone Graft Substitutes for Spine Fusion: A Brief Review." *World Journal of Orthopaedics* 6 (6): 449–56. <https://doi.org/10.5312/wjo.v6.i6.449>.
- Henkel, Jan, Maria A. Woodruff, Devakara R. Epari, Roland Steck, Vaida Glatt, Ian C. Dickinson, Peter F.M. Choong, Michael A. Schuetz, and Dietmar W. Hutmacher. 2013. "Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions-A 21st Century Perspective." *Bone Research* 1 (3): 216–48. <https://doi.org/10.4248/BR201303002>.

- Huang, Di, Lulu Niu, Jian Li, Jingjing Du, Yan Wei, Yinchun Hu, Xiaojie Lian, Weiyi Chen, and Kaiqun Wang. 2018. "Reinforced Chitosan Membranes by Microspheres for Guided Bone Regeneration." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 81 (February): 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.03.006>.
- Hussain, Rabiul, Murshid Iman, and Tarun K Maji. 2014. "Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan and Their Effect on the Release Behavior of Essential Oil from Chitosan and Chitosan-Gelatin Complex Microcapsules" 37: 69–77.
- Ikada, Yoshito. 2006. "Challenges in Tissue Engineering." *Journal of the Royal Society Interface* 3 (10): 589–601. <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0124>.
- Iu, X laohua L, and P X M A Eter. 2017. "Abstracts of the 40th Annual Meeting of the United Kingdom Environmental Mutagen Society, 25th–28th June 2017 at the Park Inn Hotel, Leuven, Belgium." *Mutagenesis* 32 (6): 607–28. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex033>.
- Jacob, S. (2002). *Human Anatomy: a Clinacally- Orientated Approach*. 1ª Edição, New York: Churchill Livingstone. Nova Iorque.
- Jeong, Jiwoon, Jung Hun Kim, Jung Hee Shim, Nathaniel S. Hwang, and Chan Yeong Heo. 2019. "Bioactive Calcium Phosphate Materials and Applications in Bone Regeneration." *Biomaterials Research* 23 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>.
- Jiang, Chengling, Zhiliang Wang, Xueqin Zhang, Xiaoqun Zhu, Jun Nie, and Guiping Ma. 2014. "Crosslinked Polyelectrolyte Complex Fiber Membrane Based on Chitosan-Sodium Alginate by Freeze-Drying." *RSC Advances* 40 (78): 41551–60. <https://doi.org/10.1039/c4ra04208e>.
- Jin, Hyeong Ho, Dong Hyun Kim, Tae Wan Kim, Keun Koo Shin, Jin Sup Jung, Hong Chae Park, and Seog Young Yoon. 2012. "In Vivo Evaluation of Porous Hydroxyapatite/Chitosan-Alginate Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *International Journal of Biological Macromolecules* 51 (5): 1079–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.027>.
- Kamboj, N., Rodríguez, M. A., Rahmani, R., Prashanth, K. G. & Hussainova, I. Bioceramic scaffolds by additive manufacturing for controlled delivery of the antibiotic vancomycin. *Proc. Est. Acad. Sci.* **68**, 185–190 (2019).
- Kanasan, Nanthini, Sharifah Adzila, Nor Azimahmustaffa, and P. Gurubaran. 2017. "The Effect of Sodium Alginate on the Properties of Hydroxyapatite." *Procedia Engineering* 184: 442–48. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.04.115>.
- Kikuchi, Masanori, and Daisuke Kanama. 2007. "Current Status of Biomaterial Research Focused on Regenerative Medicine." *Quarterly Review* 24 (January 2007): 51–67. <http://www.nistep.go.jp/achiev/ftx/eng/stfc/stt024e/qr24pdf/STTqr2404.pdf>.
- Kim, Hye Lee, Gil Yong Jung, Jun Ho Yoon, Jung Suk Han, Yoon Jeong Park, Do Gyoon Kim, Miqin Zhang, and Dae Joon Kim. 2015. "Preparation and Characterization of Nano-Sized Hydroxyapatite/Alginate/Chitosan Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Materials Science and Engineering C* 54: 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.033>.
- Kolassa, Norbert, Christian Punzengruber, Josef Suko, and Madoka Makinose. 1979. *Mechanism of Calcium-Independent Phosphorylation of Sarcoplasmic Reticulum ATPase by Orthophosphate. Evidence of Magnesium-Phosphoprotein Formation. FEBS Letters*. Vol. 108. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80596-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80596-7).
- Krishnakumar, Gopal Shankar, Sowndarya Sampath, Shalini Muthusamy, and Mary Arlene John. 2019. "Importance of Crosslinking Strategies in Designing Smart Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Systematic Review." *Materials Science and Engineering C* 96 (October): 941–54. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.081>.
- Kucharska, Martyna, Beata Butruk, Katarzyna Walenko, Tomasz Brynk, and Tomasz Ciach. 2012. "Fabrication of In-Situ Foamed Chitosan/ β -TCP Scaffolds for Bone Tissue Engineering Application." *Materials Letters* 85: 124–27. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.07.002>.
- Kulig, Dominika, Anna Zimoch-Korzycka, Andrzej Jarmoluk, and Krzysztof Marycz. 2016. "Study on

- Alginate-Chitosan Complex Formed with Different Polymers Ratio." *Polymers* 8 (5): 1–17. <https://doi.org/10.3390/polym8050167>.
- Laurencin, C. T., A. M. A. Ambrosio, M. D. Borden, and J. A. Cooper. 1999. "Tissue Engineering: Orthopedic Applications." *Annual Review of Biomedical Engineering* 1 (1): 19–46. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.1.1.19>.
- Lewis, S., Dirksen, S., Heitkemper, M., & Bucher, L. (2016). *Medical- Surgical Nursing: Assessment and Management of Clinical Problems*. 10ª Edição, Elsevier.
- Li, B., Brown, K. V., Wenke, J. C. & Guelcher, S. A. Sustained release of vancomycin from polyurethane scaffolds inhibits infection of bone wounds in a rat femoral segmental defect model. *J. Control. Release* **145**, 221–230 (2010).
- Liao, Chun Jen, Feng Huei Lin, Ko Shao Chen, and Jui Sheng Sun. 1999. "Thermal Decomposition and Reconstitution of Hydroxyapatite in Air Atmosphere." *Biomaterials* 20 (19): 1807–13. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00076-9).
- Liao, Jianguo, Yanqun Li, Haiyan Li, Jingxian Liu, Yufen Xie, Jianping Wang, and Yongxiang Zhang. 2018. "Preparation, Bioactivity and Mechanism of Nano-Hydroxyapatite/Sodium Alginate/Chitosan Bone Repair Material." *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials* 16 (1): 28–35. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000372>.
- Liu, Jun, Stefan Willför, and Chunlin Xu. 2015. "A Review of Bioactive Plant Polysaccharides: Biological Activities, Functionalization, and Biomedical Applications." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5 (1): 31–61. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.001>.
- Lu, Jiayu, Chi Cheng, Yu Shi He, Chengqi Lyu, Yufei Wang, Jia Yu, Ling Qiu, Derong Zou, and Dan Li. 2016. "Multilayered Graphene Hydrogel Membranes for Guided Bone Regeneration." *Advanced Materials* 28 (21): 4025–31. <https://doi.org/10.1002/adma.201505375>.
- Lu, Tingli, Yuhui Li, and Tao Chen. 2013. "Techniques for Fabrication and Construction of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering." *International Journal of Nanomedicine* 8: 337–50.
- Luís, J. (2010). *Espetroscopia de tempos de vida de aniquilação do positrão no estudo dos processos de relaxação e absorção de humidade num polímero comercial*. Tese de Mestrado em Engenharia Física. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra.
- Luís, J. (2010). *Espetroscopia de tempos de vida de aniquilação do positrão no estudo dos processos de relaxação e absorção de humidade num polímero comercial*. Tese de Mestrado em Engenharia Física. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra.
- Macmillan, Adam K., Francis V. Lamberti, Julia N. Moulton, Benjamin M. Geilich, and Thomas J. Webster. 2014. "Similar Healthy Osteoclast and Osteoblast Activity on Nanocrystalline Hydroxyapatite and Nanoparticles of Tri-Calcium Phosphate Compared to Natural Bone." *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 5627–37. <https://doi.org/10.2147/IJN.S66852>.
- Madhally, Sundararajan V., and Howard W.T. Matthew. 1999. "Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering." *Biomaterials* 20 (12): 1133–42. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00011-3).
- Marie, P.J. 1992. "Physiology of Bone Tissue." *Immuno-Analyse et Biologie Specialisee* 7 (6): 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(05\)80182-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(05)80182-6).
- Martino, Alberto Di, Michael Sittinger, and Makarand V. Risbud. 2005. "Chitosan: A Versatile Biopolymer for Orthopaedic Tissue-Engineering." *Biomaterials* 26 (30): 5983–90. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.016>.
- Mehdikhani, Behzad, and Gholam Hossein Borhani. 2014. "Densification and Mechanical Behavior of β -Tricalcium Phosphate Bioceramics." *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* 36 (September 2018): 37–49. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilcpa.36.37>.
- Meng, Xin, Feng Tian, Jian Yang, Chun Nian He, Nan Xing, and Fan Li. 2010. "Chitosan and Alginate Polyelectrolyte Complex Membranes and Their Properties for Wound Dressing Application." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (5): 1751–59. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-3996-6>.

- Monreal Romero, Humberto A., José Mora Ruacho, Carlos A. Martínez Pérez, and Perla E. García Casillas. 2013. "Synthesis of Hydroxyapatite Nanoparticles in Presence of a Linear Polysaccharide." *Journal of Materials* 2013: 1–5. <https://doi.org/10.1155/2013/683268>.
- Nair, Renjini M., B. Bindhu, and Reena V L. 2020. "A Polymer Blend from Gum Arabic and Sodium Alginate - Preparation and Characterization." *Journal of Polymer Research* 27 (6): 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02128-y>.
- Nazeer, Muhammad Anwaar, Emel Yilgör, and Iskender Yilgör. 2017. "Intercalated Chitosan/Hydroxyapatite Nanocomposites: Promising Materials for Bone Tissue Engineering Applications." *Carbohydrate Polymers* 175 (March 2018): 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.054>.
- Ölmez, S. S., P. Korkusuz, H. Bilgili, and Seveda Şenel. 2007. "Chitosan and Alginate Scaffolds for Bone Tissue Regeneration." *Pharmazie* 62 (6): 423–31. <https://doi.org/10.1691/ph.2007.6.6140>.
- Omidi-Kashani, Farzad, Ebrahim Ghayem Hasankhani, and Amir Ashjazadeh. 2014. "Lumbar Spinal Stenosis: Who Should Be Fused? An Updated Review." *Asian Spine Journal* 8 (4): 521–30. <https://doi.org/10.4184/asj.2014.8.4.521>.
- Oryan, Ahmad, Amir Kamali, Ali Moshiri, Hossien Baharvand, and Hamed Daemi. 2018. "Chemical Crosslinking of Biopolymeric Scaffolds: Current Knowledge and Future Directions of Crosslinked Engineered Bone Scaffolds." *International Journal of Biological Macromolecules* 107 (PartA): 678–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>.
- Parker, Scott L., Saniya S. Godil, Stephen K. Mendenhall, Scott L. Zuckerman, David N. Shau, and Matthew J. McGirt. 2014. "Two-Year Comprehensive Medical Management of Degenerative Lumbar Spine Disease (Lumbar Spondylolisthesis, Stenosis, or Disc Herniation): A Value Analysis of Cost, Pain, Disability, and Quality of Life: Clinical Article." *Journal of Neurosurgery: Spine* 21 (2): 143–49. <https://doi.org/10.3171/2014.3.SPINE1320>.
- Parent, M. *et al.* Hydroxyapatite microporous bioceramics as vancomycin reservoir: Antibacterial efficiency and biocompatibility investigation. *J. Biomater. Appl.* **31**, 488–498 (2016).
- Patil S. (2008). Crosslinking Of Polysaccharides : Methods And Applications Crosslinking Of Polysaccharides: Methods And Applications. *Pharmaceutical Reviews*.
- Peh, K., T. Khan, and H. Ch'ng. 2000. "Mechanical, Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan Films for Wound Dressing." *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques* 3 (3): 303–11.
- Pereira, Rúben, Anabela Carvalho, Daniela C. Vaz, M. H. Gil, Ausenda Mendes, and Paulo Bárto. 2013. "Development of Novel Alginate Based Hydrogel Films for Wound Healing Applications." *International Journal of Biological Macromolecules* 52 (1): 221–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.09.031>.
- Pighinelli, and Guimaraes MF. 2015. "Properties of Hydrochloric Chitosan Solutions Modified With Nano- Calcium Phosphate Complex." *Journal of Tissue Science & Engineering* 06 (03). <https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000155>.
- Pina, Sandra, Viviana P. Ribeiro, Catarina F. Marques, F. Raquel Maia, Tiago H. Silva, Rui L. Reis, and J. Miguel Oliveira. 2019. "Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications." *Materials* 12 (11). <https://doi.org/10.3390/ma12111824>.
- Qu, Huawei. 2019. "RSC Advances Biomaterials for Bone Tissue Engineering Scaffolds :," 26252–62. <https://doi.org/10.1039/c9ra05214c>.
- Queiroz, Moacir Fernandes, Karoline Rachel Teodosio Melo, Diego Araujo Sabry, Guilherme Lanzi Sasaki, and Hugo Alexandre Oliveira Rocha. 2015. "Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?" *Marine Drugs* 13 (1): 141–58. <https://doi.org/10.3390/md13010141>.
- Rajkumar, M., N. Meenakshisundaram, and V. Rajendran. 2011. "Development of Nanocomposites

- Based on Hydroxyapatite/Sodium Alginate: Synthesis and Characterisation." *Materials Characterization* 62 (5): 469–79. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2011.02.008>.
- Rodríguez-Vázquez, Martin, and Rodrigo Ramos-Zúñiga. 2019. "Chitosan-Hydroxyapatite Scaffold for Tissue Engineering in Experimental Lumbar Laminectomy and Posterolateral Spinal Fusion in Wistar Rats." *Asian Spine Journal* 5200 (33675). <https://doi.org/10.31616/asj.2019.0091>.
- Rodríguez-vázquez, Martin, Brenda Vega-ruiz, Rodrigo Ramos-zúñiga, Daniel Alexander Saldaña-koppel, and Luis Fernando Quiñones-olvera. 2015. "Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine" 2015.
- Rose, Felicity R.A.J., and Richard O.C. Oreffo. 2002. "Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6519>.
- Roseti, Livia, Valentina Parisi, Mauro Petretta, Carola Cavallo, Giovanna Desando, Isabella Bartolotti, and Brunella Grigolo. 2017. "Scaffolds for Bone Tissue Engineering : State of the Art and New Perspectives." *Materials Science & Engineering C* 78: 1246–62. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.
- Russo, Fabrizio, Luca Ambrosio, and Vincenzo Denaro. 2014. "Handbook of Bioceramics and Biocomposites." *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*, no. October. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-09230-0>.
- Saravanan, S., R. S. Leena, and N. Selvamurugan. 2016. "Chitosan Based Biocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *International Journal of Biological Macromolecules* 93: 1354–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.112>.
- Schimandle, Jeffrey H., and Scott D. Boden. 1997. "Bone Substitutes for Lumbar Fusion: Present and Future." *Operative Techniques in Orthopaedics* 7 (1): 60–67. [https://doi.org/10.1016/S1048-6666\(97\)80023-7](https://doi.org/10.1016/S1048-6666(97)80023-7).
- Schlickewei, Wolfgang, and Carsten Schlickewei. 2007. "The Use of Bone Substitutes in the Treatment of Bone Defects - The Clinical View and History." *Macromolecular Symposia* 253 (January): 10–23. <https://doi.org/10.1002/masy.200750702>.
- Sg, Kumbhar, and Pawar Sh. 2017. "Self-Functionalized , Oppositely Charged Chitosan-Alginate Scaffolds for Biomedical Applications." *Biotechnology* 13 (2): 1–15.
- Shangari, Nandita, and Peter J. O'Brien. 2004. "The Cytotoxic Mechanism of Glyoxal Involves Oxidative Stress." *Biochemical Pharmacology* 68 (7): 1433–42. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.06.013>.
- Sharma, Chhavi, Amit Kumar Dinda, Pravin D. Potdar, Chia Fu Chou, and Narayan Chandra Mishra. 2016. "Fabrication and Characterization of Novel Nano-Biocomposite Scaffold of Chitosan-Gelatin-Alginate-Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering." *Materials Science and Engineering C* 64: 416–27. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.060>.
- Sharma, Sandeep K., Jitendra Bahadur, Pushkar N. Patil, Priya Maheshwari, Saurabh Mukherjee, Kathi Sudarshan, Subhasish Mazumder, and Pradeep K. Pujari. 2013. "Revealing the Nano-Level Molecular Packing in Chitosan-NiO Nanocomposite by Using Positron Annihilation Spectroscopy and Small-Angle X-Ray Scattering." *ChemPhysChem* 14 (5): 1055–62. <https://doi.org/10.1002/cphc.201200902>.
- Shpotyuk, Olha, Adam Ingram, and Oleh Shpotyuk. 2016. "Free Volume Structure of Acrylic-Type Dental Nanocomposites Tested with Annihilating Positrons." *Nanoscale Research Letters* 11 (1). <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1751-8>.
- Simón-yarza, T., Garbayo, E., Tamayo, E., Prósper, F. & Blanco-prieto*, M. J. Chapter 9.1. Drug Delivery in Tissue Engineering: General Concepts. 501–526 (2012). doi:10.1039/9781849735292-00501
- Sowjanya, J. A., J. Singh, T. Mohita, S. Sarvnan, A. Moorthi, N. Srinivasan, and N. Selvamurugan. 2013. "Biocomposite Scaffolds Containing Chitosan/Alginate/Nano-Silica for Bone Tissue Engineering." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 109: 294–300.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.006>.

- Spivak, Jeffrey M., and Amir Hasharoni. 2001. "Use of Hydroxyapatite in Spine Surgery." *European Spine Journal* 10 (SUPPL. 2): 197–204. <https://doi.org/10.1007/s005860100286>.
- Starkweather, Angela R., Linda Witek-Janusek, Russ P. Nockels, Jonna Peterson, and Herb L. Mathews. 2008. "The Multiple Benefits of Minimally Invasive Spinal Surgery: Results Comparing Transforaminal Lumbar Interbody Fusion and Posterior Lumbar Fusion." *Journal of Neuroscience Nursing* 40 (1): 32–39. <https://doi.org/10.1097/01376517-200802000-00006>.
- Sundarrajan, Parani, Prabakaran Eswaran, Alexander Marimuthu, Lakshmi Baddireddi Subhadra, and Pandian Kannaiyan. 2012. "One Pot Synthesis and Characterization of Alginate Stabilized Semiconductor Nanoparticles." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 33 (10): 3218–24. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.10.3218>.
- Szymańska, Emilia, and Katarzyna Winnicka. 2015. "Stability of Chitosan - A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications." *Marine Drugs* 13 (4): 1819–46. <https://doi.org/10.3390/md13041819>.
- Teng, Shu Hua, Eun Jung Lee, Byung Ho Yoon, Du Sik Shin, Hyoun Ee Kim, and Joong Soo Oh. 2009. "Chitosan/Nanohydroxyapatite Composite Membranes via Dynamic Filtration for Guided Bone Regeneration." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 88 (3): 569–80. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31897>.
- Torres, M. L., J. M. Fernandez, F. G. Dellatorre, A. M. Cortizo, and T. G. Oberti. 2019. "Purification of Alginate Improves Its Biocompatibility and Eliminates Cytotoxicity in Matrix for Bone Tissue Engineering." *Algal Research* 40 (April): 101499. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101499>.
- Venkatesan, J., and S. K. Kim. 2014. *Chitosan for Bone Repair and Regeneration. Bone Substitute Biomaterials*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857099037.3.244>.
- Venkatesan, Jayachandran, Ira Bhatnagar, Panchanathan Manivasagan, Kyong Hwa Kang, and Se Kwon Kim. 2015. "Alginate Composites for Bone Tissue Engineering: A Review." *International Journal of Biological Macromolecules* 72: 269–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>.
- Venkatesan, Jayachandran, and Se Kwon Kim. 2010. "Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering - An Overview." *Marine Drugs* 8 (8): 2252–66. <https://doi.org/10.3390/md8082252>.
- Venkatesan, Jayachandran, R. Nithya, Prasad N. Sudha, and Se Kwon Kim. 2014. *Role of Alginate in Bone Tissue Engineering. Advances in Food and Nutrition Research*. 1st ed. Vol. 73. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00004-4>.
- Wang, Huailan, Wenjia Sun, Dongliang Fu, Yueliang Shen, Ying ying Chen, and Lin lin Wang. 2018. "Update on Biomaterials for Prevention of Epidural Adhesion after Lumbar Laminectomy." *Journal of Orthopaedic Translation* 13: 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.02.001>.
- Wang, Limin, and Jan P. Stegemann. 2011. "Glyoxal Crosslinking of Cell-Seeded Chitosan/Collagen Hydrogels for Bone Regeneration." *Acta Biomaterialia* 7 (6): 2410–17. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.029>.
- Wang, Wenhao, and Kelvin W.K. Yeung. 2017. "Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review." *Bioactive Materials* 2 (4): 224–47. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.
- Wang, Zongliang, Tianlin Gao, Ligu Cui, Yu Wang, Peibiao Zhang, and Xuesi Chen. 2016. "Improved Cellular Infiltration into 3D Interconnected Microchannel Scaffolds Formed by Using Melt-Spun Sacrificial Microfibers." *RSC Advances* 6 (3): 2131–34. <https://doi.org/10.1039/c5ra25142g>.
- Williams, David F. 2009. "On the Nature of Biomaterials." *Biomaterials* 30 (30): 5897–5909. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>.
- Wongwitwichot, P, J Kaewsrichan, K.H Chua, and B.H.I Ruszymah. 2014. "Comparison of TCP and TCP/HA Hybrid Scaffolds for Osteoconductive Activity." *The Open Biomedical Engineering Journal* 4 (1): 279–85. <https://doi.org/10.2174/1874120701004010279>.

- Xidaki, Despoina, Panagiota Agrafioti, Dimitra Diomatari, Archontia Kaminari, Eleftherios Tsalavoutas-Psarras, Polyxeni Alexiou, Vasilios Psycharis, Effie C. Tsilibary, Spyridon Silvestros, and Marina Sagnou. 2018. "Synthesis of Hydroxyapatite, β -Tricalcium Phosphate and Biphasic Calcium Phosphate Particles to Act as Local Delivery Carriers of Curcumin: Loading, Release and in Vitro Studies." *Materials* 11 (4). <https://doi.org/10.3390/ma11040595>.
- Xu, Sanzhong, Xiaoyi Chen, Xianyan Yang, Lei Zhang, Guojing Yang, Huifeng Shao, Yong He, and Zhongru Gou. 2016. "Preparation and In Vitro Biological Evaluation of Octacalcium Phosphate/Bioactive Glass-Chitosan/Alginate Composite Membranes Potential for Bone Guided Regeneration." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16 (6): 5577–85. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11734>.
- Xu, Sijia, Jianheng Liu, Licheng Zhang, Fei Yang, Peifu Tang, and Decheng Wu. 2017. "Effects of HAp and TCP in Constructing Tissue Engineering Scaffolds for Bone Repair." *Journal of Materials Chemistry B* 5 (30): 6110–18. <https://doi.org/10.1039/c7tb00790f>.
- Yang, Qing, Fengdong Dou, Borun Liang, and Qing Shen. 2005. "Studies of Cross-Linking Reaction on Chitosan Fiber with Glyoxal." *Carbohydrate Polymers* 59 (2): 205–10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.09.013>.
- Yuan, Youling, Betsy M Chesnutt, Warren O Haggard, and Joel D Bumgardner. 2011. "Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in Vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures," 1399–1416. <https://doi.org/10.3390/ma4081399>.
- Yunus Basha, Rubaiya, Sampath Kumar Sampath, and Mukesh Doble. 2015. "Design of Biocomposite Materials for Bone Tissue Regeneration." *Materials Science and Engineering C* 57: 452–63. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.016>.
- Zhang, Ke, Yubo Fan, Nicholas Dunne, and Xiaoming Li. 2018. "Effect of Microporosity on Scaffolds for Bone Tissue Engineering." *Regenerative Biomaterials* 5 (2): 115–24. <https://doi.org/10.1093/rb/rby001>.
- Zhang, Y, X Zhang, B Shi, and RJ Miron. 2013. "Membranes for Guided Tissue and Bone Regeneration." *Annals of Oral and Maxillofacial Surgery* 1 (1). <https://doi.org/10.13172/2052-7837-1-1-451>.
- Zhang, Yong, and Miqin Zhang. 2001. "Microstructural and Mechanical Characterization of Chitosan Sca € Olds Reinforced by Calcium Phosphates - 2001 - Unknown(2).Pdf" 282: 159–64.
- Zhou, Ding, Chao Qi, Yi Xuan Chen, Ying Jie Zhu, Tuan Wei Sun, Feng Chen, and Chang Qing Zhang. 2017. "Comparative Study of Porous Hydroxyapatite/Chitosan and Whitlockite/Chitosan Scaffolds for Bone Regeneration in Calvarial Defects." *International Journal of Nanomedicine* 12: 2673–87. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131251>.
- Zhou, J., Zhou, X. G., Wang, J. W., Zhou, H. & Dong, J. Treatment of osteomyelitis defects by a vancomycin-loaded gelatin/ β -tricalcium phosphate composite scaffold. *Bone Jt. Res.* 7, 46–57 (2018).

ANEXOS

ANEXO A – Revisão bibliográfico de membranas para liberação de fármaco

Devido à pandemia algumas análises foram postas de parte devido à limitação da entrega desta dissertação para finalização de curso. A incorporação do fármaco *Vancomycin* e a análise da liberação do mesmo foram umas delas, no entanto tinha já sido feito um estudo prévio destes temas.

Muitas das terapias atuais a fim de diligenciar a regeneração e reparação do tecido em análise não têm eficácia suficiente, por isso a pesquisa de um perfil de liberação de fármaco controlado paralelamente com o equilíbrio da regeneração óssea têm trazido um novo desafio à comunidade científica. Nos últimos anos, tem existido progressos no campo da administração de medicamentos sugerido a par das principais descobertas como moléculas bioativas e matrizes artificiais (membranas). Os implantes poliméricos fazem parte da primeira geração destes sistemas de entrega de fármacos, podendo estes serem administrados de duas formas: no revestimento da superfície da membrana ou incorporado na rede polimérica da membrana (Simón-Yarza *et al.*, 2012).

As infeções são um fator significativo, comprometendo a cura do osso de fraturas ou lesões. A presença destas infeções tem um efeito dramático nos resultados dos pacientes, uma vez que 37% dos pacientes experimentam um atraso na união óssea, e no pior dos casos pode levar à amputação (Li *et al.*, 2010). De modo, a reduzir o número de injeções e evitar grandes doses a longo prazo, que causem efeitos colaterais como toxicidade renal e ototoxicidade, é necessário um sistema de liberação controlada contendo fármacos para aliviar o sofrimento destes pacientes. Nesta geração, a emergência de membranas com o objetivo também de entrega de fármacos tem expandido e ganhado cada vez mais potencial do que a entrega de fármacos de forma convencional.

A porosidade da membrana é de vital importância na regeneração óssea. Outros fatores, também já antes relatados, são importantes na sua estrutura, incluindo resistência mecânica e taxas de degradação desejáveis. A combinação destas propriedades em membranas com carregamento de antibióticos nele, é a chave para prevenir lesões nos ossos causadas por infeções, e possibilitando assim uma regeneração óssea mais eficaz (Du *et al.*, 2017). Na Figura A.1 apresenta-se um esquema básico de um *scaffold* carregado com este fármaco, envolvendo células ósseas necessárias para a regeneração óssea.

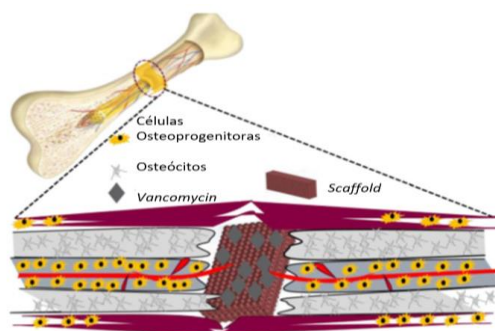


Figura A.1 Scaffold para ETO com entrega de fármaco (Kamboj *et al.*, 2019).

A escolha do antibiótico deve ser bem ponderada, a fim de erradicar ou prevenir a infecção com sucesso, sem promover o desenvolvimento de resistência aos medicamentos e prejudicar o processo natural de cicatrização óssea (Parent *et al.*, 2016). Na Figura A.2 é apresentado as curvas típicas para sistemas de liberação de fármacos. Uma membrana ideal para liberação de fármaco deve seguir os seguintes critérios (Guilinger *et al.*, 1987; Domb & Mikos, 2007):

- **Capacidade de carregamento:** definida como a quantidade de fármaco que pode ser administrada na membrana. Idealmente uma membrana deve ser carregada de forma máxima.
- **Distribuição de fármaco:** o fármaco deve estar disperso de forma homogênea na membrana;
- **Afinidade de ligação:** quão firmemente o medicamento está ligado à membrana. A afinidade de ligação não deve ser grande, a fim de permitir a sua liberação;
- **Cinética de liberação:** deve existir um controlo de liberação, de forma a dose do fármaco chegar ao destino no período idealizado;
- **Estabilidade:** estabilidade que o fármaco oferece aquando a incorporação na membrana à temperatura fisiológica, visto os medicamentos necessitarem de manter a sua estrutura e atividade por um certo período de tempo.

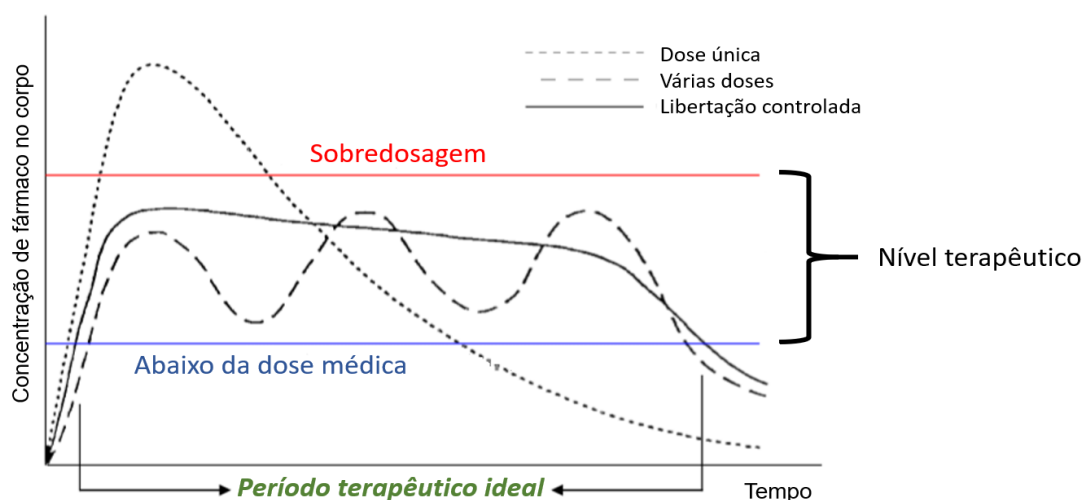


Figura A.2. Curvas típicas de sistemas de liberação de fármacos.

Consequentemente, a *Vancomycin* foi uma escolha para este estudo, pois é um antibiótico ativo contra bactérias em infecções ósseas. Além disso, vários estudos demonstraram que *in vitro* este fármaco é muito menos tóxico contra células de mamíferos do que outros antibióticos (Parent *et al.*, 2016).

A *Vancomycin* é um antibiótico glicopeptídico tricíclico eficaz no tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, particularmente para o tratamento da osteomielite crónica (infecções nos ossos) (Li *et al.*, 2010; Bakhsheshi-Rad *et al.*, 2017; Kamboj *et al.*, 2019). Após a colonização inicial, o

S. aureus pode produzir uma multicamada de biofilme muito difícil de erradicar usando antibióticos (Cheng *et al.*, 2018). Possui menos efeitos negativos sobre os osteoblastos e células esqueléticas comparativamente com outros antibióticos comumente usados *in vitro*, e não impede o crescimento ósseo em lesões *in vivo*. Idealmente, um sistema de administração deve gerir *Vancomycin* acima da concentração antibacteriana efetiva (isto é, a concentração inibitória mínima) de forma sustentável. Para o tratamento de osteomielite, é aconselhável que a liberação de antibióticos exceda a concentração inibitória mínima por 6 a 8 semanas (Li *et al.*, 2010). A base deste tratamento segue uma combinação de múltiplos desbridamentos cirúrgicos e antibioticoterapia sistêmica seguida de enxerto ósseo (Zhou *et al.*, 2018). Os materiais substitutos de enxerto ósseo sem atividade antibacteriana são muitas vezes vulneráveis à adesão bacteriana e formação de biofilme, levando eventualmente à falha do tratamento. Um tratamento bem-sucedido de osteomielite crônica e defeitos ósseos infetados deve assim eliminar as bactérias e aumentar a regeneração óssea (Cheng *et al.*, 2018).

Cheng *et al.* (2018), averiguou que a difusão da *Vancomycin* carregada nos mesoporosos do *scaffold* requiere um tempo de penetração mais longo, o que explica parcialmente a manutenção de liberação controlada deste fármaco. A rápida liberação inicial combinada com a liberação sustentada de *Vancomycin* aumentou acentuadamente a capacidade antibacteriana de membranas, acabando com bactérias planctônicas a curto prazo e inibindo a colonização bacteriana a longo prazo. A ação deste fármaco facilitou o tratamento da infecção no interior do defeito ósseo. Kamboj *et al.* (2019), observou que mais de 50% da *Vancomycin* carregada foi libertada das membranas durante as primeiras 40h, seguida de uma liberação sustentada de quase 20% durante os seis dias seguintes. A taxa de liberação diminuiu depois significativamente com o tempo, porém a liberação cumulativa continuou a aumentar lentamente durante os seis dias seguintes, atingindo uma liberação máxima de 70% de *Vancomycin* carregada. A rápida liberação do medicamento atribuiu-se aos macroporos das membranas. Pelo contrário, a liberação lenta e sustentada de fármacos foi atribuída à microporosidade das membranas. Bakhsheshi-Rad *et al.* (2017), demonstraram o efeito positivo deste fármaco no teste antimicrobiano e que este efeito está significativamente relacionado com a concentração de *Vancomycin*, em que *scaffolds* com maior concentração do medicamento apresentaram maiores zonas de inibição contra a bactéria *S. aureus*.

Também já há estudos deste fármaco incorporados em *scaffolds* com fosfatos de cálcio, analisados neste projeto, mas ainda são muito escassos. Zhou *et al.*, 2018, examinou que o aumento do conteúdo de β -TCP, levou a uma diminuição de duração de liberação destes *scaffolds* compósitos. Com a HAp, Parent *et al.* (2016), averigou que bactérias no material com maior concentração de fármaco exibiram uma morfologia diferente, com uma mudança de forma, que provavelmente está ligada ao mecanismo de ação do fármaco, que inibe uma etapa crítica na síntese de peptidoglicanos da parede celular bacteriana. Ambos os estudos obtiveram resultados eficientes, o que demonstra a potencialidade destes compostos.

Estes estudos apresentados na Tabela A.1 são todos muito recentes (2016-2019) e ainda não totalmente compreendidos, o que demonstra a necessidade de exploração nesta área e desenvolvimento de materiais promissores para a entrega de fármacos de forma eficaz, o que pode contribuir para uma redução de custos e desconforto para os pacientes.

Tabela A.1 Observações de algumas propriedades de *scaffolds* com *Vancomycin*.

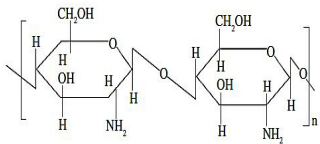
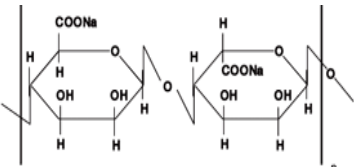
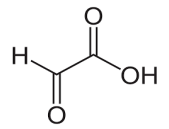
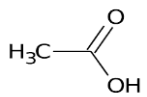
Aplicação	Materiais usados	Observações	Referências
Estudo da liberação de <i>Vancomycin</i> em <i>scaffolds</i> compósitos	<ul style="list-style-type: none"> PCL (<i>polycaprolactone</i>) Si – $CaSiO_3$ 	<ol style="list-style-type: none"> O fármaco carregado nos <i>scaffolds</i> teve duas etapas de comportamento na liberação: inicialmente houve uma liberação rápida e depois libertou-se de forma mais lenta; As estruturas macro/mesoporosas deste <i>scaffold</i> teve um comportamento de liberação sustentada na distribuição do fármaco; <i>Scaffolds</i> biocerâmicos possuíram uma estrutura circular de macroporos com tamanho de poro 400 μm e porosidade 35%. Além disso, os mesoporos foram obtidos com tamanho de poro de 15 a 50 μm. A porosidade controlável a nível macro e meso combinada com o revestimento de polímero biocompatível (PCL) tornou possível fabricar <i>scaffolds</i> para regeneração óssea e sustentar a liberação de <i>Vancomycin</i>. 	(Kamboj <i>et al.</i> , 2019)
Eficiência dos <i>scaffolds</i> na eliminação de infecções e reparação de defeitos de osteomielite em coelhos	<ul style="list-style-type: none"> Gelatina β-TCP 	<ol style="list-style-type: none"> Os <i>scaffolds</i> de gelatina apresentaram quantidades diferentes de β-TCP (0%, 10%, 30% e 50%), o <i>scaffold</i> com 0% exibiu a maior duração da liberação de <i>Vancomycin</i>, com uma duração de liberação de oito semanas; A liberação completa do fármaco com maior concentração de TCP foi alcançada em três semanas; No tratamento de defeitos de osteomielite em coelhos, o <i>scaffold</i> com 30% de TCP demonstrou o desempenho mais eficaz na eliminação de infecções e na reparação de defeitos ósseos; Os <i>scaffolds</i> compósitos exibiram uma estrutura porosa 3D homogeneamente interconectada. 	(Zhou <i>et al.</i> , 2018)
Estudo sobre a liberação <i>in vitro</i> de várias concentrações de <i>Vancomycin</i>, atividade antibacteriana e biocompatibilidade de <i>scaffolds</i> nanoestruturados	<ul style="list-style-type: none"> $Ca_3ZrSi_2O_9$ 	<ol style="list-style-type: none"> <i>Scaffolds</i> com o fármaco apresentaram inibição completa do crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>; a incorporação de <i>Vancomycin</i> nos <i>scaffolds</i> levou à inibição do crescimento e proliferação de <i>S. aureus</i>; O número de células ligadas aos <i>scaffolds</i> com <i>Vancomycin</i> reduziu com o aumento da quantidade do fármaco. A adição altamente concentrada deste pode induzir stress nas células, estimulando sua atividade mitocondrial e diminuindo a sua motilidade; 	(Bakhsheshi-Rad <i>et al.</i> , 2017)

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS À BASE DE QUITOSANO
PARA APLICAÇÃO NA REGIÃO LOMBAR

		<ol style="list-style-type: none"> 3. Os <i>scaffolds</i> com <i>Vancomycin</i> possuíram alta porosidade (80-82%) e resistência à compressão adequada (0,86-0,88 MPa); 4. Foi observada liberação controlada do fármaco, indicando seu potencial uso em engenharia de tecidos ósseos. 	
<p>Análise de <i>scaffolds</i> com diferentes concentrações de <i>Vancomycin</i> (V) na atividade antibacteriana, quantidade de liberação e efeito nas células pré-osteoblásticas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • HAp 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Foi observada uma redução drástica da concentração bacteriana nos <i>scaffolds</i> carregados com o fármaco, com uma erradicação completa das unidades viáveis de formação de colônias no <i>scaffold</i> com a maior carga antibiótica. As poucas bactérias no material com 50 mg/mL exibiram uma morfologia diferente, com uma mudança de forma; 2. Redução significativa da adesão de células pré-osteoblásticas foi destacada para o <i>scaffold</i> com maior carga de fármaco. 	(Parent <i>et al.</i> , 2016)
<p>Análise de liberação de <i>Vancomycin</i> e efeito antibacteriano de <i>scaffolds</i> compósitos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • PLGA <i>poly(lactide-co-glycolide)</i> • <i>Bioactive glass</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Amostras carregadas com <i>Vancomycin</i> possuíram uma atividade antibacteriana estável, levando a bons efeitos anti-biofilme; 2. A viabilidade celular e a diferenciação osteogénica não foram suprimidas após o carregamento do fármaco; 3. Os <i>scaffolds</i> carregados produziram uma liberação rápida inicial, seguida de uma liberação relativamente lenta, que inibe efetivamente a adesão bacteriana e a formação de biofilme; 4. <i>Scaffolds</i> carregados também prolongaram a liberação efetiva do medicamento até por oito semanas e a liberação cumulativa atingiu mais de 50%. 	(Cheng <i>et al.</i> , 2018)

ANEXO B – Propriedades e Estruturas químicas dos reagentes usados

Tabela B.1 Propriedades, estruturas e fórmulas químicas, códigos R (perigo) e S (procedimentos de segurança), obtidos através das fichas MSDS dos compostos.

Reagente	Fórmula Química	Estrutura Química	Massa Volúmica (g/L)	Peso Molecular (g/mol)	Código R	Código S
Quitosano	$(C_6H_{11}NO_4)_n$		0.15-0.3	1526.464	R36/37/38	S36/37/39 S45
Alginato de Sódio	$(C_6H_7Na)_n$		–	216.121	R36/37/38	S24/25-36-26
Glioxal (40%)	$C_2H_2O_2$		–	58.036	R30-36 R38-43-68	S36/37
Ácido Acético	$C_2H_4O_2$		1.119	64.08	R10 a 35	S23-26-35

ANEXO C – Espectros FTIR de cada material usado na formulação das membranas

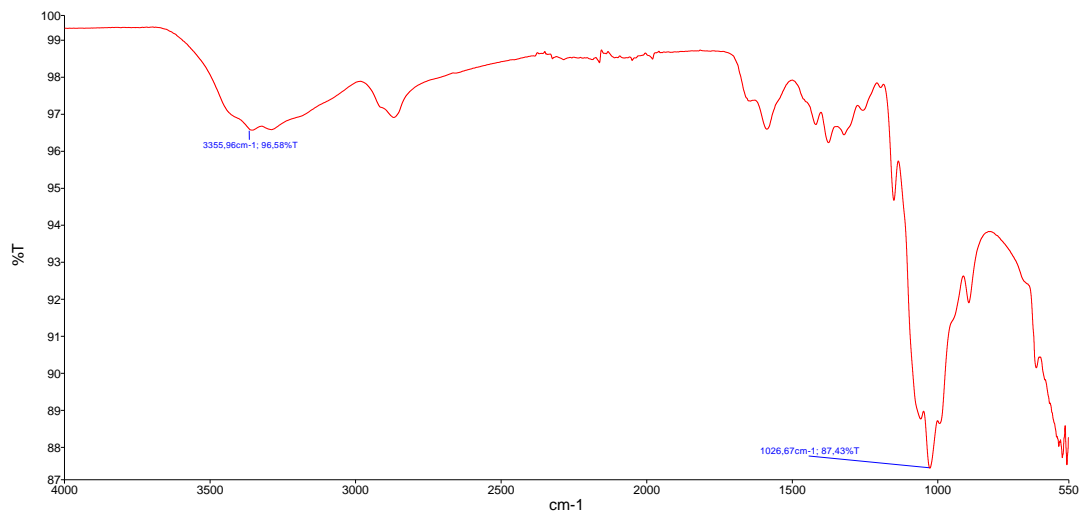


Figura C.1 Espectro FTIR do polímero de quitosano.

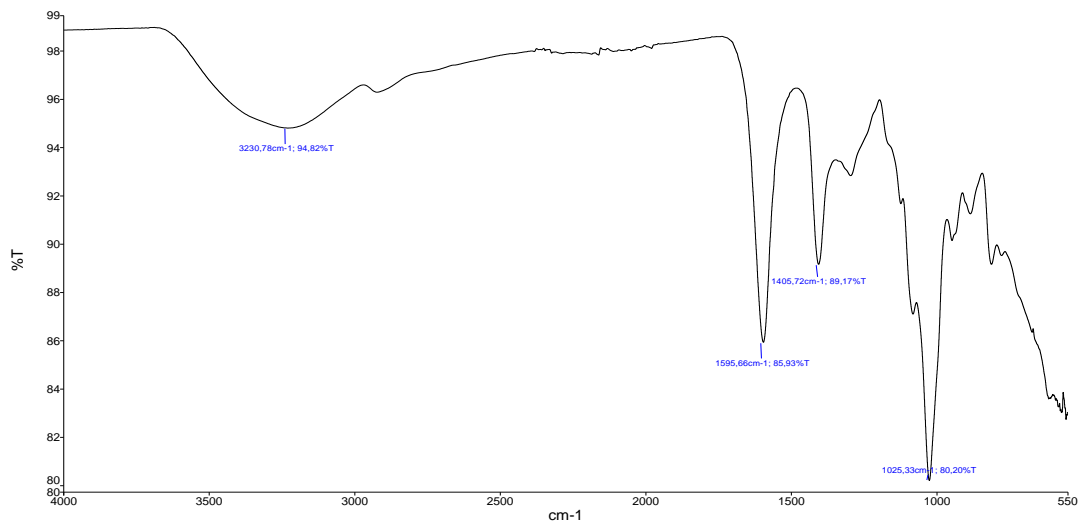


Figura C.2 Espectro FTIR do polímero de alginato de sódio.

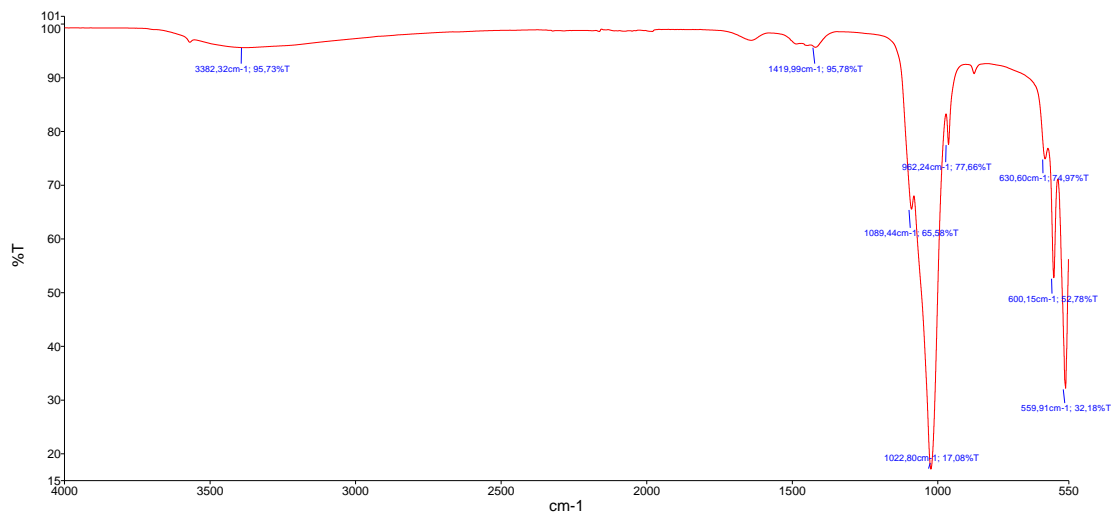


Figura C.3 Espectro FTIR do fosfato de cálcio de nanohidroxiapatite.

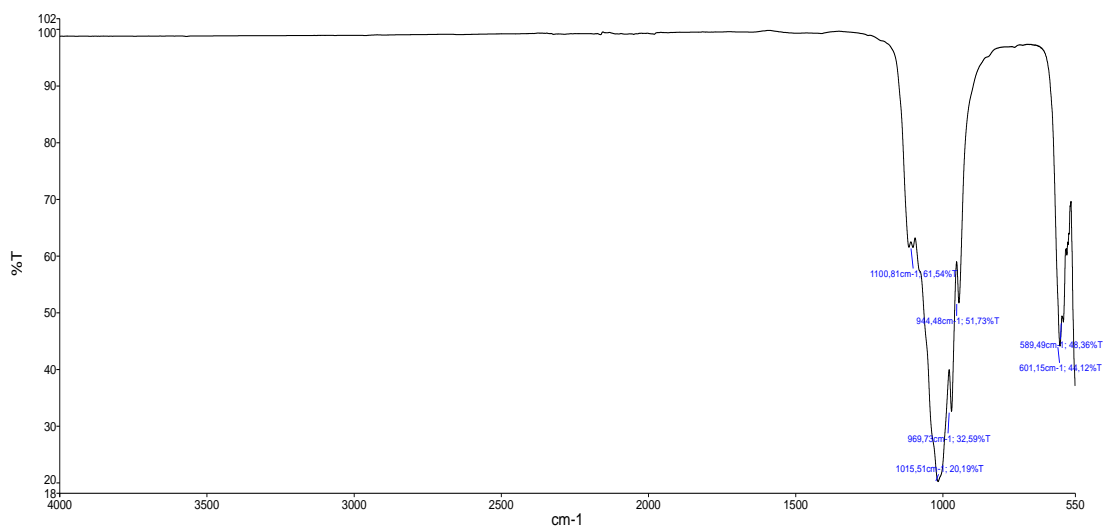


Figura C.4 Espectro FTIR do fosfato de cálcio do β -TCP.

ANEXO D – Rotina em Matlab (The MathWorks, Inc), para cálculo do raio e do volume livre através do modelo de Tao-Eldrup

```
clear all

format long

figure ;

while true;

msg = { '      Introduza tau 3: '};

titulo = 'Cálculo do raio através do modelo de Tao-Eldrup';

nlinhas = 1;

def = {'1.800000'};

taus=inputdlg(msg,titulo,nlinhas,def);

tau = str2double(taus);

pos = [60 300 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {'O tau introduzido foi:'};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);

pos = [160 300 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);
```

```
string = taus;

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);

pos = [230 300 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {'(ns)'};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);

fim=0;

r1=(0.332000+2.000000/pi)*tau-0.166000-1.000000/pi;

r2=(0.332000-2.000000/pi)*tau-0.166000+1.000000/pi;

if (r1<r2);

    de=r1;

    ate=r2;

else

    de=r2;

    ate=r1;

end;

for nint=1:1:30

    nint=nint+1;
```



```
desvio1=1000.000000;  
  
x=0;  
  
y=0;  
  
k=de;  
  
passo=abs(ate-de)/100.000000;  
  
for k=de:passo:ate;  
  
    if k>ate;  
  
        break;  
  
    end;  
  
    x=x+1;  
  
    t(x)=0.5000/(1.0000-  
(k/(k+0.1660))+((sin(2.0000*pi*k/(k+0.1660))/(2.0000*pi))));  
  
    r(x)=k;  
  
end;  
  
for x=1:1:100;  
  
    desvio=abs(t(x)-tau);  
  
    if (desvio<desvio1);  
  
        y=x;  
  
        desvio1=desvio;  
  
    elseif (desvio==0)  
  
        y=x;
```

```
    fim=1;

    break;

end;

end;

if y>10

    if (r(y-10)>r(y+10));

        ate=r(y-10);

        de=r(y+10);

    else

        ate=r(y+10);

        de=r(y-10);

    end

elseif y>4 && y<11

    if (r(y-4)<r(y+4));

        de=r(y-4);

        ate=r(y+4);

    else

        de=r(y+4);

        ate=r(y-4);

    end

end
```

```
elseif y>1 && y< 5

    if (r(y-1)<r(y+1));

        de=r(y-1);

        ate=r(y+1);

    else

        de=r(y+1);

        ate=r(y-1);

    end

else

    fim=1;

end

end

raio=10.0*r(y);

tempo=t(y);

volume=4.0*pi*raio^3/3;

pos = [60 200 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {'O raio é:'};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);
```

```
pos = [105 200 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {num2str(raio,10)};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);

pos = [230 200 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {'(Angstroms)'};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);

pos = [60 150 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {'O volume é: '};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);

pos = [120 150 200 200];
```

```
ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {num2str(volume,10)};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);
```

```
pos = [230 150 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {'(Angstroms^3)'};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);

pos = [60 100 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {'O tau calculado é:'};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);

pos = [150 100 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {num2str(tempo,10)};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string);

set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);

pos = [230 100 200 200];

ht = uicontrol('Style','Text','Position',pos);

string = {'(ns)'};

[outstring,newpos] = textwrap(ht,string); set(ht,'String',outstring,'Position',newpos);
```


ANEXO E – Cálculo da média da porosidade e desvio padrão associado pelo Método de Porosidade do Etanol

Tabela E.1 Quatro execuções (a)-(d) para análise da porosidade de cada membrana (*H*, *BH*, *AQ* e *B*), com os respetivos volumes (*V2*) (proveta com etanol mais o *scaffold* após o vácuo), volumes (*V3*) (residuais da proveta com etanol já saem o *scaffold* após o vácuo) e grau de porosidade (ϵ) calculado pela expressão já referida no subcapítulo 3.2.5 (5).

(a)

Membrana	V2 (mL)	V3 (mL)	ϵ_1
<i>H7</i>	3,1	2,5	0,83
<i>BH1</i>	3,2	2,6	0,67
<i>AQ1</i>	3,3	2,8	0,40
<i>B5</i>	3,1	2,7	0,75

(b)

Membrana	V2 (mL)	V3 (mL)	ϵ_2
<i>H7</i>	3,1	2,6	0,80
<i>BH1</i>	3,1	2,8	0,67
<i>AQ1</i>	3,1	2,6	0,80
<i>B5</i>	3,2	2,7	0,60

(c)

Membrana	V2 (mL)	V3 (mL)	ϵ_3
<i>H7</i>	3,1	2,8	0,67
<i>BH2</i>	3,1	2,9	0,50
<i>AQ1</i>	3,2	2,8	0,50
<i>B5</i>	3,1	2,7	0,75

(d)

Membrana	V2 (mL)	V3 (mL)	ϵ_4
<i>H7</i>	3,2	2,8	0,50
<i>BH2</i>	3,1	2,7	0,75
<i>AQ1</i>	3,2	2,9	0,33
<i>B5</i>	3,1	2,7	0,75

A seguir são representados os cálculos da média da porosidade de cada membrana e conseqüente desvio padrão associado.

$$\bar{\epsilon}_H = \frac{(0,83 + 0,80 + 0,67 + 0,50)}{4} \approx 0,70$$

$$\bar{\epsilon}_{BH} = \frac{(0,67 + 0,67 + 0,50 + 0,75)}{4} \approx 0,65$$

$$\bar{\epsilon}_{AQ} = \frac{(0,40 + 0,80 + 0,50 + 0,33)}{4} \approx 0,51$$

$$\bar{\epsilon}_B = \frac{(0,75 + 0,60 + 0,75 + 0,75)}{4} \approx 0,71$$

O desvio padrão (σ) é calculado a partir:

$$\text{Desvio Padrão } (\sigma) = \sqrt{\frac{\sum(xi - \bar{x})}{n}} \quad (6)$$

$$\sigma_H = \sqrt{\frac{(0,83 - 0,70)^2 + (0,80 - 0,70)^2 + (0,67 - 0,70)^2 + (0,50 - 0,70)^2}{4}} \approx 0,1377$$

$$\sigma_{BH} = \sqrt{\frac{(0,67 - 0,65)^2 + (0,50 - 0,65)^2 + (0,67 - 0,65)^2 + (0,75 - 0,65)^2}{4}} \approx 0,0912$$

$$\sigma_{AQ} = \sqrt{\frac{(0,40 - 0,51)^2 + (0,80 - 0,51)^2 + (0,50 - 0,51)^2 + (0,33 - 0,51)^2}{4}} \approx 0,1794$$

$$\sigma_B = \sqrt{\frac{(0,75 - 0,71)^2 + (0,60 - 0,71)^2 + (0,75 - 0,71)^2 + (0,75 - 0,71)^2}{4}} \approx 0,065$$

