



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Filipa Gouveia Simão

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS DE BASE
DEXTRANO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Dissertação no âmbito de Engenharia Química, orientada pela Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

julho de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Filipa Gouveia Simão

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS DE BASE
DEXTRANO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

**Dissertação no âmbito de Engenharia Química, orientada pela Doutora Patrícia de
Jesus Pinto Alves e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra**

julho de 2021

Agradecimentos

A todas as pessoas que estiveram presentes ao longo deste percurso e que contribuíram de alguma forma para a concretização do trabalho, quero deixar umas palavras.

Primeiramente, um enorme obrigada à Dr.^a Patrícia Alves por todo o acompanhamento incansável durante este longo percurso, pela forma como orientou o trabalho e pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

De notar a postura incansável da investigadora Teresa Cernadas, que sempre esteve disponível para esclarecer as dúvidas da melhor forma e que sempre esteve disposta a ensinar e transmitir boas práticas laboratoriais, sempre com a simpatia que a caracteriza. Um obrigada também às investigadoras Marta Santos e à Filipa Dinis pela companhia e auxílio no laboratório.

Quero deixar um agradecimento especial a três amigos, que partilharam comigo esta caminhada, são eles António Aragão, Bruno Alves e Beatriz Sampaio. Ao António e ao Bruno um imenso obrigada pela companhia nas pausas de trabalho e pela boa disposição e sentido de humor sempre presente. Um especial obrigada à Beatriz, pelas razões anteriores e ainda a acrescentar o apoio e companheirismo, na qualidade de colega de laboratório, por todas as partilhas de dúvidas, pela troca de ideias e pelo apoio nas fases mais críticas.

Não poderia deixar de agradecer a duas amigas importantes, à Andreia Alves e à Daniela Pacheco que sempre estiveram presentes e sempre me deram motivação. Deixo também um obrigada ao Bruno Almeida, por ter acompanhado o meu percurso de forma positiva, e ter desempenhado o seu papel de melhor amigo tão bem como sempre o faz.

Por fim, e não menos importante, um obrigada à minha família que está sempre presente, acreditando nas minhas capacidades, que está sempre disponível para solucionar qualquer problema e que sempre apoiou as minhas escolhas.

Um enorme obrigada a todos que acompanharam esta jornada e fizeram parte dela, cada um à sua maneira!

A todos o meu sincero agradecimento,
Filipa Simão

Resumo

As infecções ósseas derivadas de doenças ou de lesões constituem um problema na atualidade, e os métodos para as tratar têm algumas lacunas e alguns problemas relacionados. No caso dos auto e aloenxertos, os principais problemas são a falta de doadores e o risco de infecções. Enquanto que no caso dos implantes e substitutos ósseos, a rejeição é o principal obstáculo. O campo da Engenharia de Tecidos apresenta alternativas, como matrizes tridimensionais de suporte com vista a promover a regeneração dos tecidos lesionados. Apesar das vantagens destes materiais, a maioria deles têm associado um procedimento cirúrgico invasivo. De modo a contornar estas questões, o principal foco da presente dissertação é o desenvolvimento de matrizes de suporte para regeneração óssea, sob a forma de hidrogéis injetáveis, que possibilitem a regeneração do tecido ósseo à medida que se degradam, e que não envolvam procedimentos invasivos.

Ao longo deste trabalho serão desenvolvidos hidrogéis injetáveis a partir de dois materiais de base natural, o dextrano e a gelatina, e ainda a utilização de dois compostos inorgânicos, β -trifosfato de cálcio e nano hidroxiapatite, para reforço das propriedades mecânicas. De modo a compreender a influência de alguns parâmetros na formulação, serão testadas várias composições variando a quantidade de reticulante (AAD (ácido adípico dihidrazida) e gelatina) e a presença de inorgânicos na matriz polimérica.

Para compreender se o material desenvolvido apresenta as características necessárias para a aplicação em vista, este foi submetido a métodos de caracterização. Foram realizadas análises de FTIR (Infravermelho por Transformada de Fourier) e RMN (Ressonância Magnética Nuclear) para caracterizar quimicamente o hidrogel e para verificar a modificação química dos polímeros. Tendo em conta os requisitos para a aplicação em vista, foi avaliada a capacidade de inchaço do hidrogel, assim como a sua degradação em ambiente fisiológico simulado. De modo a auxiliar o processo de regeneração, foi incorporada Vancomicina na matriz polimérica e posterior avaliação do perfil de libertação da mesma. A biocompatibilidade do material foi avaliada através do teste MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), com osteoblastos.

Por fim, para avaliar a influência das várias composições do material nas propriedades mecânicas, foram realizados testes de compressão.

Os resultados obtidos mostraram que a síntese de hidrogéis à base de dextrano foi bem sucedida, ao contrário dos hidrogéis à base de gelatina. De modo geral, os hidrogéis obtidos apresentaram uma degradabilidade adequada, cerca de um mês, o que coincide com o tempo médio do processo de regeneração óssea. Os testes de compressão originaram valores favoráveis para o módulo de Young (200-300 kPa), contudo apresentaram alguma variabilidade devido à geometria da amostra.

Nos testes de liberação obteve-se um perfil com um *burst* inicial entre 50 e 80% do fármaco, o que dificulta um tratamento prolongado, mas pode facilitar a prevenção de infecções no período inicial. Relativamente à biocompatibilidade do material, os resultados mostraram alguma citotoxicidade, o que sugere que tal seja devido à influência do AAD.

Palavras-chave: Dextrano Oxidado, Gelatina Modificada, Hidrogéis Injetáveis, Regeneração Óssea, Liberação de Fármaco.

Abstract

Nowadays, bone infections due to diseases or injuries are a major problem, and the existing methods to treat them present some gaps and have several associated problems. In the case of auto and allografts, the main problems are lack of donors and the risk of infections. While, in the case of implants and bone substitutes, the rejection is the main obstacle. The field of Tissue Engineering presents alternatives, such as scaffolds, to promote regeneration of injured tissues. Despite the advantages of these materials, most of them have an invasive surgical procedure associated. In order to avoid these problems, the main focus of this thesis is the development of scaffolds for bone regeneration, in the form of injectable hydrogels, which allow the regeneration of bone as they degrade and do not involve invasive procedures.

Throughout this work, injectable hydrogels will be developed based on two natural polymers, dextran and gelatin, along with the use of two inorganic compounds, calcium β -triphosphate and nanohydroxyapatite, to reinforce the mechanical properties. In order to understand the influence of some parameters on formulation, different compositions were tested, varying the amount of crosslinker and the presence of inorganic compounds in the polymeric matrix.

The developed material was later characterized to evaluate the necessary requirements for the intended application. FTIR and NMR analysis were performed to chemically characterize the material and to verify the chemical modification of the polymers. Taking into account the requirements for the intended application, the swelling capacity of the material was evaluated, as well as its degradation in a simulated physiological environment. To evaluate the influence of the different composition materials in mechanical properties, compression tests were performed. Vancomycin was incorporated into the polymeric matrix to assist the regeneration process, and the drug release profile was evaluated. The biocompatibility of the material was evaluated through MTS (*(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)*) assay, using osteoblasts.

The results showed that the synthesis of dextran-based hydrogels was successful, unlike gelatin-based hydrogels. In general, the hydrogels presented a suitable degradability, about one month, which are in line with the average time of the bone regeneration process. The compression tests gave favourable values for Young's modulus (200-300 kPa), however they showed some variability due to the geometry of the sample used in the analysis.

The drug release profile showed an initial burst release of around 50-80%, which makes longstanding treatment difficult, but it can facilitate the prevention of infections in the initial period. Regarding the material's biocompatibility, the results obtained showed some cytotoxicity which could be associated with AAD.

Keywords: Oxidized Dextran, Modified Gelatin, Injectable Hydrogels, Bone Regeneration, Drug Release.

ÍNDICE

Motivações, objetivos e estrutura da dissertação	1
1. Introdução.....	3
1.1. Estado da Arte.....	3
1.1.1. Cerâmicos e Cimentos Ósseos	5
1.1.2. Polímeros	6
1.1.3. Fatores de Crescimento	10
1.1.4. Células	11
1.2. Engenharia de tecidos.....	13
1.2.1. Estrutura do osso	13
1.2.2. Regeneração óssea.....	15
1.2.3. Requisitos das matrizes tridimensionais de suporte para regeneração óssea.	17
1.3. Biomateriais	19
1.3.1. Dextrano	19
1.3.2. Dextrano oxidado	20
1.3.3. Gelatina.....	21
1.3.4. Gelatina modificada	22
1.3.5. Nano hidroxiapatite (nHAp)	23
1.3.6. Fosfato tricálcico (β -TCP)	24
1.4. Hidrogéis Injetáveis.....	25
1.4.1. Requisitos dos hidrogéis injetáveis	26
1.5. Liberação de fármacos.....	28
1.5.1. Vancomicina	29
2. Materiais e métodos	31
2.1. Materiais	31
2.2. Procedimento	32
2.2.1. Oxidação do Dextrano	33
2.2.2. Determinação do grau de oxidação	34
2.2.3. Síntese dos Hidrogéis DexOx/AAD.....	34

2.2.4.	Modificação da Gelatina	36
2.2.5.	Síntese dos Hidrogéis DexOx/MGel.....	38
2.3.	Caracterização	39
2.3.1.	Caracterização química	39
2.3.1.1.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	39
2.3.1.2.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)	40
2.3.2.	Capacidade de Inchaço	41
2.3.3.	Estudos de degradação.....	41
2.3.4.	Incorporação do fármaco na matriz de suporte e sua liberação	41
2.3.5.	Testes de Compressão.....	43
2.3.6.	Testes de Biocompatibilidade	44
3.	Resultados e discussão	47
3.1.	Síntese dos Hidrogéis.....	48
3.2.	Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada -FTIR-ATR	50
3.3.	Ressonância Magnética nuclear – RMN.....	54
3.4.	Oxidação do Dextrano	56
3.5.	Capacidade de Inchaço	57
3.6.	Estudos de degradação.....	58
3.7.	Testes de Compressão.....	66
3.8.	Liberação de Vancomicina.....	67
3.9.	Testes de Biocompatibilidade	70
4.	Conclusões e trabalhos futuros	73
4.1.	Conclusões	73
4.2.	Trabalhos futuros.....	76
5.	Referências bibliográficas	79

Índice de Figuras

Figura 1 - Componentes essenciais na engenharia de tecidos.	4
Figura 2 - Estrutura do osso (adaptado de [24]).....	14
Figura 3 - Esquema representativo da oxidação do Dex através da reação com Periodato de Sódio. (A) Primeira oxidação, introdução dos grupos aldeídos no C3 e no C4. (B) Segunda oxidação, introdução do grupo aldeído no C2 e libertação de ácido fórmico.....	21
Figura 4 - Representação esquemática da modificação da Gel.....	23
Figura 5 - Estrutura química da nHAp.	24
Figura 6 - Estrutura química do β -TCP.	25
Figura 7 - Mecanismos de libertação de fármacos.	29
Figura 8 - Estrutura química da vancomicina.	29
Figura 9- Esquema representativo do processo da diálise à liofilização.	33
Figura 10 - Reticulação do DexOx com AAD. (A) DexOx. (B) AAD. (C) DexOx reticulado, formação da ligação hidrazona.	35
Figura 11 -Esquema da preparação dos hidrogéis.....	36
Figura 12 - Representação esquemática da MGel.	37
Figura 13 - Representação esquemática da reticulação da MGel e do DexOx.	38
Figura 14 - Representação esquemática da incorporação do fármaco na matriz de suporte. Solução A e B representam as soluções que formam o hidrogel.	42
Figura 15 - Equipamento utilizado para os testes de compressão (Hegewald & Peschke, Inspekt Mini Series).....	44
Figura 16 - Esquema do modo de aplicação dos hidrogéis através de uma seringa de dois tubos.....	47
Figura 17 - Hidrogéis DexOx/AAD, com as diferentes composições.....	48
Figura 18 - Hidrogéis em proporções 5/5 (m/m) de DexOx/MGel.....	49
Figura 19 - Espectro obtido por FTIR-ATR do AAD, Dex, DexOx e do hidrogel DexOx/AAD.	50
Figura 20 - Espectro obtido por FTIR-ATR do nHAp, do β -TCP e dos hidrogéis com nHAp e β -TCP.	52
Figura 21 - Espectro obtido por FTIR-ATR da Gel e da MGel.....	53
Figura 22 - Espectros de RMN, DexOx (DO=50%) (a), DexOx (DO=25%) (b) e DexOx (DO=50%) reagido com tBC (c), DexOx (DO=25%) reagido com tBC (d), com os picos a 8,3 ppm (*) e a 4,8 ppm (1) assinalados.	55
Figura 23 – Rácio de capacidade de inchaço a diferentes valores de pH e diferentes composições (n=2).....	57
Figura 24 - Perfis de degradação (variação de massa em função do tempo) das diferentes amostras a pH 7,4 (n=2).....	59
Figura 25 - Perfis de degradação (variação de massa em função do tempo) das diferentes amostras a pH 2 (n=2).....	61
Figura 26 - Perfis de degradação (variação de massa em função do tempo) das diferentes amostras a pH 9 (n=2).....	62

Figura 27 - Perfis de degradação (variação de massa em função do tempo) das diferentes amostras a pH 5 (n=2).....	63
Figura 28 - Cronograma do processo de cicatrização/regeneração óssea.	64
Figura 29 - Perfis cumulativos de libertação controlada de Vancomicina para as diversas composições de hidrogéis, (n=3).	68
Figura 30 - Resultados da viabilidade celular dos osteoblastos após 1, 3 e 7 dias de contacto com os hidrogéis (n=5).....	71

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Informação dos materiais utilizados e respetivas aplicações.	31
Tabela 2 - Composições dos hidrogéis de DexOx e AAD.....	36
Tabela 3 - Composição dos hidrogéis produzidos com MGel.	39
Tabela 4 - Bandas características da ligação amida num espectro de FTIR-ATR. [55]	53
Tabela 5 - Grau de oxidação do Dex, dados teóricos e experimentais.	56
Tabela 6 - Módulo de Young para as várias composições das amostras (n=3).	66
Tabela 7 - Doses recomendadas.	69
Tabela 8 - Avaliação de todas as composições em estudo para cada teste realizado ao longo do trabalho.....	75

Lista de símbolos e abreviaturas

- AAD – Ácido adípico dihidrazida
- AEMA – 2-aminoetilmetacrilato
- ASCs – Células estaminais derivadas de tecido adiposo
- BMPs – Proteínas morfogénicas ósseas
- Dex – Dextrano
- DexOx – Dextrano oxidado
- DO – Grau de Oxidação
- ECM – Matriz extracelular
- ED – Etilenodiamina
- EDC – *1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*
- ET – Engenharia de Tecidos
- FGFs – Fatores de crescimento de fibroblastos
- FTIR-ATR – Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada
- Gel – Gelatina
- GelMA – Gelatina funcionalizada com metacrilato
- HA – Ácido Hialurónico
- hOB – Células normais de osteoblasto humano
- IGFs – Fatores de crescimento semelhantes à insulina
- LCST – *Lower critical solution temperature*
- m_{DexOx} – a massa utilizada na solução de DexOx
- m_f – Massa final
- m_i – Massa inicial
- Mw_{AAD} – a massa molar do AAD
- $Mw_{\text{Res Glu}}$ – é a massa molar do resíduo de glucose
- MGel – Gelatina modificada
- MR – Medicina Regenerativa
- MSCs – Células estaminais mesenquimais
- nHAp – Nano hidroxiapatite

- PBS – Tampão fosfato salino
- PCL – Policaprolactona
- PEG – Poli(etilenoglicol)
- PGA – Poli(ácido glicólico)
- PLA – Poli(ácido láctico)
- PLGA – Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
- PM – Peso Molecular
- PRP – Plasma rico em plaquetas
- PTH – Hormona da paratiroide
- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- S_r – *Swelling ratio* (rácio de capacidade de inchaço)
- SaOS-2 – Células da linhagem de sarcoma osteogénico humano
- SLC – Sistemas de libertação controlada
- V – Volume de água destilada utilizado na preparação da solução de DexOx
- VEGFs – Fatores de crescimento endoteliais vasculares
- β -TCP – Fosfato Tricálcico

Motivações, objetivos e estrutura da dissertação

Atualmente, um elevado número de pessoas possui problemas ósseos, estando estes associados a doenças (cancro, osteomielite) ou a lesões (fraturas), que muitas vezes são remediados recorrendo a auto e aloenxertos de osso, ou com implantes/próteses. Apesar destas soluções funcionarem, apresentam várias falhas, tais como falta de dadores, risco de infeções, morte dos tecidos circundantes, rejeição dos implantes, que por vezes causam dor e desconforto no paciente e todos eles requerem procedimentos invasivos. [1]

Nas últimas décadas, a engenharia de tecidos (ET) tem sido cada vez mais reconhecida no ramo da medicina e tem vindo a proporcionar soluções mais seguras e simples para a resolução de problemas, trazendo menos desconforto e menos riscos para os pacientes. [2],[3] Uma das vertentes da engenharia de tecidos, é o desenvolvimento de matrizes tridimensionais de suporte (*scaffolds*), pré formados ou injetáveis, para regeneração de tecido ósseo. Estas estruturas têm em vista substituir as alternativas já existentes, promovendo a regeneração do tecido lesionado, através da incorporação de substâncias ativas na matriz. [4] Desta forma o desenvolvimento de matrizes de suporte injetáveis, que permitam a incorporação de substâncias ativas, torna-se promissor, constituindo uma alternativa aos implantes e enxertos, conseguindo contornar os problemas da falta de dadores de osso, da rejeição de próteses e seus efeitos associados. Evita ainda a necessidade de recorrer a procedimentos invasivos e consequentemente traz vantagens em termos estéticos para o paciente. Para além disso é ainda uma alternativa versátil, na medida em que se adapta à lesão, podendo assumir a morfologia do defeito por mais irregular que este seja, permite também uma fácil incorporação das substâncias ativas durante a sua preparação e reduz o risco de infeções. [5]

A presente dissertação tem em vista a produção de hidrogéis injetáveis à base de dextrano e de gelatina para regeneração óssea. Estes hidrogéis têm como finalidade o preenchimento de defeitos em tecido ósseo para promover a sua regeneração, através da presença de substâncias bioativas. O dextrano, sendo um polissacarídeo, portanto um polímero natural, proporciona vantagens, nomeadamente a sua biocompatibilidade. A gelatina é também um material biocompatível sendo que é derivado do colagénio, que está presente em muitos

tecidos biológicos. Neste trabalho o dextrano é modificado, através da introdução de grupos aldeídos, para permitir a sua reticulação tornando possível a formação de um hidrogel, no caso da gelatina a modificação é feita com a mesma finalidade, através da introdução de grupos amina. Para além disso, os hidrogéis permitem a incorporação de fármacos na matriz, o que proporciona um auxílio, no processo de cura da lesão, evitando processos infecciosos. No presente trabalho testou-se a incorporação de vancomicina que pertence ao grupo de antibióticos e apresenta carácter bactericida. Para além do fármaco foi também testado a incorporação de materiais inorgânicos de modo a melhorar as propriedades mecânicas do material. O hidrogel tem de apresentar uma boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, assim como uma estrutura porosa adequada à proliferação, adesão e diferenciação celular e ainda deve exibir propriedades mecânicas apropriadas.

Esta dissertação está dividida em 4 capítulos principais. O capítulo 1 é constituído pelo “State of the Art”, seguido de um enquadramento teórico que permite associar os vários conceitos abordados ao longo da dissertação, entre eles, biomateriais, hidrogéis injetáveis, regeneração óssea e a incorporação de fármacos em matrizes tridimensionais de suporte.

No capítulo 2 são descritos todos os materiais e métodos utilizados no procedimento laboratorial, assim como a caracterização física e química dos hidrogéis finais e ainda os testes de libertação controlada e os testes biológicos.

O capítulo 3 diz respeito à apresentação e discussão de resultados, relativos à síntese e caracterização dos hidrogéis obtidos no trabalho laboratorial.

Para finalizar, o capítulo 4, onde são relatadas as conclusões finais do trabalho assim como a perspetiva futura do mesmo.

1. Introdução

1.1. Estado da Arte

A perda de órgãos ou de tecidos biológicos está normalmente associada a traumas ou a doenças graves. No caso particular de questões relacionados com tecido ósseo, inicialmente estes problemas são solucionados recorrendo a alo e autoenxertos ósseos, assim como a implantes. Apesar do cumprimento das suas funções, estas alternativas não são inteiramente satisfatórias. Os autoenxertos consistem em enxertos ósseos retirados de um local e transplantados para outro, pertencente ao mesmo indivíduo. Este processo, apesar de cumprir a função, e apresentar as propriedades necessárias de um enxerto ósseo (osteoindução, osteocondução e osteogénese) apresenta alguns problemas, como a dificuldade e durabilidade do procedimento cirúrgico e possível risco de infeção no local da recolha de osso, e a pouca quantidade de material ósseo disponível. Para combater estes problemas, os aloenxertos foram considerados uma alternativa, estes consistem em enxertos de osso, provenientes de um indivíduo diferente, mas da mesma espécie. Esta alternativa tem a vantagem de poder personalizar o enxerto e de haver várias formas disponíveis tais como derivados processados de osso cortical e esponjoso. [6] No entanto, esta alternativa apresenta muitos problemas, como a falta de propriedades osteoindutoras e de componentes celulares devido aos processos de desvitalização por irradiação ou aos processos de liofilização. [1] Além disso, apresenta imunogenicidade e uma baixa taxa de sucesso, resultando por vezes em rejeição, provocada pela ativação de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade. [6]

De modo a colmatar estes problemas, a engenharia de tecidos surge, tendo em vista produzir novos tecidos para substituir ou restaurar tecidos danificados. A ET é ainda responsável por introduzir o conceito de matriz tridimensional de suporte, trazendo assim uma nova solução para preencher algumas das lacunas dos processos existentes. Este conceito pretende, através do uso de biomateriais, restaurar tecidos danificados, repondo e melhorando a sua função primordial, tendo como aliado posterior, o campo da medicina regenerativa (MR), usufruindo da capacidade regenerativa dos tecidos vivos. [7] Combinando estes dois campos, houve um avanço significativo nesta área científica, podendo dividir-se em três gerações em

termos de desenvolvimento tecnológico. A primeira abrangia ligas metálicas, cerâmicos e alguns polímeros, com o objetivo de igualar as propriedades físicas do tecido alvo, mas todos estes apresentavam uma problemática adjacente, a formação de tecido fibroso na interface biomaterial-tecido e uma resposta inflamatória persistente. A segunda geração, inclui os materiais da primeira, mas com o acréscimo de revestimentos bioativos e biodegradáveis, com o intuito de evitar a formação de tecido fibroso na superfície do material, promover a osteointegração e proporcionar uma degradação, em condições fisiológicas, ao longo do processo de regeneração. Por fim, a terceira geração abrange o conhecimento das gerações anteriores, acrescentando o objetivo de alcançar o desempenho de um autoenxerto, através do uso de biomateriais com capacidades de induzir a resposta celular. Isto é, recorrendo ao estudo das células estaminais mesenquimais para promover a diferenciação destas em pré-osteoblastos. [4] Assim, a engenharia de tecidos assenta em três pilares essenciais: *scaffolds* (*biomateriais*), células e substâncias bioativas. (Fig.1).

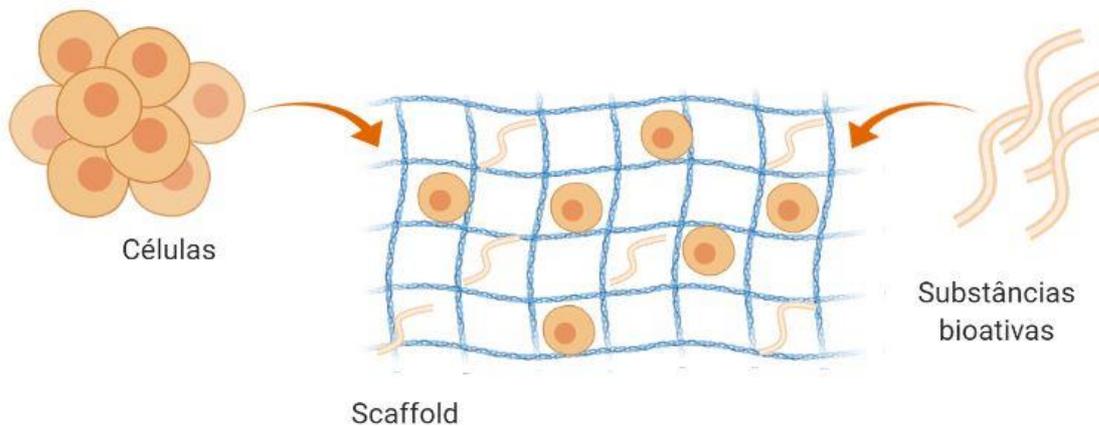


Figura 1 - Componentes essenciais na engenharia de tecidos.

De notar que todo o desenvolvimento científico alcançado ao longo dos últimos anos, tem como referência padrão os autoenxertos, visto que estes reúnem as propriedades necessárias ao processo de regeneração do tecido ósseo. Assim, todo o desenvolvimento de novos materiais tem como objetivo alcançar uma eficiência, em termos de regeneração do tecido, equivalente à dos autoenxertos. [1]

Mais ainda, a persistência dos problemas e das falhas que os auto e aloenxertos apresentavam, levou à necessidade de desenvolver novas alternativas de substitutos ósseos. Assim, a ET vem trazer novos materiais para aplicação em defeitos ósseos, podendo ser estes divididos em cerâmicos, cimentos ósseos e polímeros, sendo a sua aplicação isolada ou combinada.

1.1.1. Cerâmicos e Cimentos Ósseos

Dentro dos substitutos cerâmicos e cimentos ósseos mais utilizados nas últimas décadas, encontram-se o vidro bioativo, o sulfato de cálcio, as hidroxiapatites, o fosfato tricálcico, o fosfato de cálcio bifásico, as cerâmicas de fosfato de cálcio e cimentos de fosfato de cálcio, utilizados individualmente ou combinados entre si. Vários estudos reportam o desempenho de muitos destes substitutos ósseos e aprovam a sua aplicação clínica, no entanto, este tipo de materiais (cimentos e cerâmicos) apresenta, de modo geral, um desempenho inferior ao dos enxertos autólogos, em termos de qualidade e tempo de cicatrização do osso. Dos problemas relatados na literatura [6], constam a falta de porosidade em alguns dos materiais, tempo de degradação não adequado ou perfis de biodegradabilidade imprevisíveis/incompletos que influenciam negativamente a vascularização e o crescimento do osso e ainda propriedades mecânicas fracas, o que impossibilita a aplicação em determinados locais. [6] Devido às falhas que apresentam, a sua aplicabilidade fica condicionada, e por isso, alguns materiais destinam-se apenas a determinados problemas ou a alguns locais de lesão específicos. Isto é, muitos materiais como não reúnem as condições necessárias para ser um substituto ósseo, aplicam-se predominantemente como revestimentos em implantes, tal é o caso da hidroxiapatite e do fosfato de cálcio bifásico. No caso dos cimentos de fosfato de cálcio, a sua aplicação é direcionada para vertebroplastia percutânea e para cifoplastia. O vidro bioativo possui diversas características apelativas que o diferenciam, nomeadamente a bioatividade, a boa ligação com o osso e ainda a porosidade, contudo, devido às suas propriedades mecânicas fracas e quebradiças este é sobretudo utilizado em defeitos faciais. [6]

Um dos grandes problemas adjacentes a muitos dos cerâmicos e cimentos ósseos é a falta de propriedades osteoindutoras. De modo a preencher esta lacuna, a incorporação de

fatores de crescimento nestes materiais é uma alternativa recorrente, ou então são apenas utilizados em conjunto com materiais poliméricos.

1.1.2. Polímeros

A utilização de polímeros em matrizes tridimensionais de suporte para aplicação em tecido ósseo, abrange polímeros naturais e sintéticos. Dentro dos polímeros sintéticos investigados e utilizados, destacam-se o PEG (poli(etileno glicol)), o PGA (poli(ácido glicólico)), o PLA (poli(ácido láctico)), o PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)) e a PCL (policaprolactona). Ao contrário dos polímeros naturais, os sintéticos não possuem, na sua estrutura, elementos que permitam reconhecimento por parte das células, o que compromete a interação biomaterial-células; porém, estes podem ser produzidos em larga escala, uniformemente e com propriedades (mecânicas, de degradação, e microestrutura) bem controladas. [5]

Na área dos biomateriais, há um maior interesse pelos polímeros naturais, visto que possuem vantagem pela sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e por não causarem respostas inflamatórias (tipicamente). No entanto, não possuem boas propriedades mecânicas na maioria das vezes, portanto, recorre-se a modificações químicas ou à combinação com outros materiais, como por exemplo cerâmico bioativo, para melhorar essas mesmas propriedades. [4] Dentro dos polímeros naturais mais utilizados e estudados para produção de matrizes de suporte destinados a tratar defeitos ósseos, destacam-se o colagénio, a gelatina, o ácido hialurónico (HA), o quitosano, o alginato e o dextrano. [5], [8] Como já foi referido, os polímeros naturais apresentam a vantagem da biocompatibilidade, podem ser extraídos recorrendo a fontes naturais e possuem o benefício do reconhecimento biológico, o que auxilia a adesão e crescimento celular. Contudo, algumas das desvantagens destes materiais são o risco de transmissão de patógenos, a não uniformidade entre lotes e um custo, por norma, mais elevado.

Contudo, os seus vastos benefícios fazem com que o desenvolvimento de novos materiais se foque neste tipo de materiais. Para além disso, ultimamente o avanço científico tem dado particular atenção à produção de hidrogéis, produzidos a partir de polímeros naturais ou combinação destes com outros materiais. Este tipo de estruturas, permite obter matrizes de

suporte com elevada porosidade que possibilitam o crescimento celular, a vascularização, o transporte de nutrientes e outros fatores importantes para a regeneração óssea. [8] Em acréscimo a isso, a sua estrutura mimetiza a ECM (matriz extracelular) e o elevado teor em água nestes materiais proporciona um ambiente hidrofílico para manter a atividade das substâncias bioativas. [9]

Diversos estudos na literatura demonstram o desempenho destes polímeros naturais como hidrogéis para reparar tecido ósseo. [5], [9] Iniciando pelo alginato, um polissacarídeo linear aniônico e biocompatível, apresenta problemas como a não adesão celular nem diferenciação osteogénica, no entanto, dados da literatura reportam o desenvolvimento de microesferas de hidrogel injetáveis à base de alginato para encapsular células estaminais de origem dentária, sendo estas responsáveis pela parte de diferenciação celular. [5] Demonstrou-se que as células permaneceram viáveis na estrutura do hidrogel e que ocorreu mineralização ectópica, dentro e em torno das microesferas, devido à eficiência no transporte de nutrientes e oxigénio. Devido à degradação muito lenta do alginato, foram realizados testes com a incorporação de enzimas para promover a sua degradação. Destes testes, resultaram altos níveis de expressão de osteocalcinas (proteínas encontradas no osso e na dentina), devido à incorporação de células estaminais de tecido adiposo. [5], [9] Outro estudo, desenvolveu microesferas injetáveis de alginato para encapsular células estaminais mesenquimais derivadas de células estaminais pluripotentes, para regeneração óssea craniofacial. As células mantiveram-se viáveis após a injeção, e o teste em ratos demonstrou a regeneração de tecido ósseo. [5]

O HA é um dos polissacarídeos naturais mais interessantes para a ET, devido à sua abundante presença na ECM e no citoplasma das células osteoprogenitoras. [4] O HA é particularmente atraente para a produção de hidrogéis devido à sua capacidade de inchaço, hidrofiliabilidade e ainda à facilidade de encapsular substâncias bioativas. [8] Um estudo presente na literatura, relata o desenvolvimento de um hidrogel à base de HA, que incorpora um fármaco (Sinvastatina), e que para ajustar as propriedades viscoelásticas foi combinado com AEMA (2-aminoetilmetacrilato). Os resultados deste estudo demonstram melhorias nas propriedades elásticas do material com o aumento de AEMA. De modo a testar a citocompatibilidade, foram introduzidos fibroblastos no hidrogel, verificando-se assim que o material era citocompatível. Relativamente à libertação do fármaco, o material demonstrou uma libertação por um período

de 14 dias. O estudo revelou que houve proliferação de fibroblastos e mineralização. Sendo os resultados *in vitro* satisfatórios, o estudo relata ainda dados sobre estudos *in vivo*, em defeitos ósseos parietais de coelho, estes testes revelaram que a liberação do fármaco não é tão notória como os resultados *in vitro*. [4] Outro estudo relata o desenvolvimento de hidrogéis de HA, com incorporação de fatores de crescimento, em que dados do estudo revelam que os hidrogéis podem ser rapidamente degradados devido à presença de metaloproteinase da ECM. Os resultados dos testes *in vivo*, em defeito calvarial de tamanho crítico em ratos, apresentaram formação óssea. [9] No entanto, o HA apresenta algumas desvantagens como a complexidade da sua estrutura, a baixa resistência mecânica e a variabilidade de propriedades de acordo com o PM (peso molecular), isto é, para PM altos a proliferação e a angiogénese de células endoteliais é inibida enquanto que para PM baixos estes processos são promovidos. [5]

O quitosano é um derivado obtido por desacetilação da quitina, que constitui um polissacarídeo com carga positiva, apresentando uma excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, uma toxicidade baixa e é passível de degradação enzimática. [5] Devido a estas características torna-se um bom alvo para engenharia de tecidos ósseos. Um estudo desenvolveu hidrogéis de quitosano, combinado com colagénio e incorporando células estaminais derivadas da medula óssea. O efeito da presença do colagénio, revelou provocar um aumento significativo da rigidez do hidrogel, em comparação com quitosano puro. Relativamente à avaliação da proliferação celular, os hidrogéis compostos pelos dois materiais apresentaram também melhores resultados. [4] Outro estudo, desenvolveu um hidrogel injetável de quitosano modificado e combinado com PEG, a estrutura do hidrogel revelou a presença de poros interconectados adequados para transporte de fluidos biológicos, nutrientes e células. Testes *in vitro* realizados com células da linhagem de sarcoma osteogénico humano (SaOS-2), apresentaram viabilidade celular, uma adesão celular de 70% e proliferação das células crescente ao longo dos dias. Apesar destes resultados favoráveis, o estudo não apresenta testes *in vivo*. [10] Apesar das vantagens que o quitosano apresenta, tem problemas como a fraca solubilidade em soluções aquosas neutras e solventes orgânicos devido aos grupos amina e à elevada cristalinidade. Estas desvantagens conseguem ser contornadas, através da combinação com outros materiais ou recorrendo a modificações químicas, como é verificado na literatura. [5]

O colagénio é a proteína principal da ECM, estando também presente noutros tecidos biológicos nomeadamente no tecido ósseo, o que faz com que seja um bom candidato para aplicação em engenharia de tecidos ósseos. O colagénio tem características inerentes, como a biocompatibilidade e biodegradabilidade, a aptidão de estimular a proliferação e diferenciação celular e a capacidade de ser identificado pelos recetores da membrana plasmática, permitindo uma resposta celular posterior. [4] Existem vários tipos de colagénio, no entanto o tipo I é considerado o *standard*, pois apresenta menor reatividade imunológica. [8] Um estudo relata o desenvolvimento de um hidrogel de colagénio, com incorporação de fatores de crescimento. Os testes de libertação apresentaram 76% de libertação dos fatores de crescimento contidos no hidrogel. Para além destes, o estudo também revela resultados favoráveis quanto à proliferação e diferenciação de MSCs (células estaminais mesenquimais). A presença dos fatores de crescimento promoveu um aumento da expressão de marcadores relacionados com a osteogénese. [4] Dados da literatura demonstram que hidrogéis de colagénio promovem a adipogénese e a osteogénese de células estaminais, apesar disso, o facto de terem resistência mecânica fraca faz com que estes hidrogéis necessitem de ser combinados com outros materiais para melhorar as propriedades mecânicas ou então a sua aplicação destina-se apenas a tecidos moles. [5]

De um modo geral, todos estes polímeros naturais estão aptos para a produção de hidrogéis e de injetáveis, apresentando as suas vantagens e as suas lacunas. Por último, a gelatina e o dextrano, que constituem o foco deste trabalho, que consiste na síntese de hidrogéis injetáveis de dextrano e dextrano com gelatina. A gelatina é uma proteína obtida através da hidrólise do colagénio do tipo I e está disponível numa variada gama de pesos moleculares o que permite que as suas propriedades possam ser ajustadas com o peso molecular e com os tratamentos físicos e químicos. [5], [9] À semelhança do colagénio, a gelatina apresenta características apelativas para aplicação em engenharia de tecidos ósseos. A gelatina possui transição sol-gel com uma LCST (*Lower critical solution temperature*) de 37 °C, o que implica que haja uma reticulação química para poder ser utilizada como biomaterial injetável *in vivo*. Estudos na literatura relatam o desempenho de biomateriais à base de gelatina, como por exemplo o desenvolvimento de um hidrogel de gelatina e ácido hidroxibenzóico. [9] Os testes de viabilidade celular demonstraram resultados positivos e uma boa dispersão celular ao longo do hidrogel, consistindo assim num potencial candidato para aplicação em regeneração óssea.

Um outro estudo, relata o desenvolvimento de microesferas de hidrogel de GelMA (gelatina funcionalizada com metacrilato) para encapsular células estromais (células de tecido conjuntivo) de medula óssea. Dados do estudo comprovam a formação de osso favorável em defeitos ósseos de ratos, principalmente nos testes que continham fatores de crescimento incorporados no hidrogel. [9] Um outro estudo relata o desempenho de um hidrogel de gelatina com e sem fatores de crescimento incorporados. Os resultados dos testes *in vivo* em primatas, em fraturas do eixo tibial, demonstraram um melhor desempenho no hidrogel com os fatores de crescimento incorporados, em que se verificou uma cura e união do osso mais rápidas. No entanto, não existem dados de comparação com autoenxertos. [6] À semelhança de muitos dos polímeros naturais acima abordados, a gelatina tem características vantajosas para este tipo de aplicações, no entanto, como é possível verificar nos estudos disponíveis na literatura, este material é, na maioria das vezes, combinado com outros materiais, para adequar e atingir os requisitos necessários.

Relativamente ao dextrano, dados da literatura relatam o seu uso na síntese de materiais com aplicação em E.T., [11], [12], [13], [14], em particular na síntese de hidrogéis, e alguns deles para uso como injetáveis. Muitos destes estudos utilizam o dextrano em conjunto com outros materiais. Um estudo desenvolveu hidrogéis injetáveis antibacterianos e condutores à base de dextrano e quitosano, os hidrogéis apresentaram propriedades antibacterianas, boa proliferação celular e uma morfologia adequada a nível de porosidade. [15] Outro estudo apresenta a síntese de hidrogéis à base de dextrano e colagénio, que revelaram boas propriedades estruturais, mecânicas e boa biocompatibilidade. [16] Por fim, destacando dois estudos que apresentam a síntese de hidrogéis à base de dextrano [17] e à base de dextrano juntamente com gelatina. Este último para aplicação em cartilagem e com gelificação *in situ*. [18] Estes dois estudos constituem um interesse acrescido para o presente trabalho tendo em conta os materiais utilizados e as semelhantes aplicações. Assim, estes dois materiais, dextrano e gelatina serão abordados detalhadamente mais adiante.

1.1.3. Fatores de Crescimento

A incorporação de fatores de crescimento nos materiais, vem favorecer a *performance* dos mesmos, uma vez que estes fatores constituem uma pluralidade de proteínas, cuja função é

atuarem como reguladores das células e potenciarem a diferenciação e proliferação celular, sendo estes, dois processos cruciais na regeneração de tecido ósseo. [7] O uso destas substâncias bioativas visa também estimular o potencial osteoindutor e osteocondutor das células.

O presente trabalho não terá os fatores de crescimento como foco, portanto, apenas é importante referir a sua existência e o seu papel neste tipo de materiais. Assim, é apresentada, de seguida, uma breve lista dos mais utilizados em matrizes tridimensionais de suporte para regeneração óssea e respetivas referências na literatura, onde se pode encontrar relatos da sua utilização e seus benefícios.

Os fatores de crescimento mais aliciantes para as matrizes de suporte para regeneração óssea, e que foram alvo de estudo para aplicação clínica, são:

- Proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) [6]
- Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) [6], [19]
- Fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGFs) [6], [20]
- Fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) [21], [22]
- Hormona da paratiroide (PTH) [6]
- Plasma rico em plaquetas (PRP) [6]

1.1.4. Células

As células estaminais, são apelativas para esta área, devido ao potencial terapêutico, pois exibem uma elevada taxa de crescimento e são capazes de se diferenciarem no tipo de células do tecido lesionado. No entanto, as células estaminais embrionárias são as mais favoráveis para este tipo de aplicação, uma vez que estas são capazes de se diferenciarem em qualquer tipo de célula humana. Apesar do grande potencial destas células, levantam-se questões éticas à cerca do uso das mesmas, pois implica a destruição de embriões. [7]

No campo da engenharia de tecidos ósseos é comum usar alguns tipos de células:

- Células estaminais mesenquimais (MSCs);
- Células estaminais derivadas de tecido adiposo (ASCs);

- Osteoblastos
- Células endoteliais

As MSCs são células extraídas a partir da medula óssea, muitas vezes extraem-se do próprio paciente, ou seja, são MSCs autólogas. As células autólogas trazem vantagens como a uniformidade e a baixa probabilidade de ocorrerem respostas imunes, no entanto, muitas vezes estas células não estão disponíveis em quantidades adequadas para estabelecer linhas celulares úteis, devido a doenças que o paciente tenha, ou até mesmo, devido à sua idade. [7] Além disso, a qualidade das MSCs está também dependente do local de recolha e das técnicas utilizadas. A forma de contornar o problema da baixa quantidade de MSCs e a sua qualidade, passa por uma expansão *in vitro*, que permite gerar um vasto número de células progenitoras para posterior implantação. No entanto, estes procedimentos têm riscos e custos elevados associados. [1]

As ASCs são, à semelhança das anteriores, células estaminais multipotentes, mas provenientes do tecido adiposo. Estas células foram estudadas devido à abundância de tecido adiposo humano e à facilidade de aquisição. Estudos realizados, demonstraram a capacidade de diferenciação e proliferação eficientes e revelaram possuir propriedades angiogénicas. [7] Apesar das ASCs serem eficientes, alguns estudos em modelos animais demonstram que comparativamente às MSCs, o seu desempenho é inferior. [1]

As células osteoblásticas são células que estão presentes no osso natural e por isso tornam-se mais promissoras para tratamento e aplicação em tecidos ósseos. Estas células são, tipicamente, obtidas através de biópsias retiradas do osso do próprio paciente. [7] De notar que, os osteoblastos têm um papel essencial no desenvolvimento, no crescimento, na função, no reparo e na manutenção óssea. No processo de cicatrização óssea, os osteoblastos têm um papel relevante na primeira fase desta etapa, a fase de inflamação. Para além disso, na segunda fase, a de reparação, os osteoblastos são ativados para formarem osso, o que torna este tipo de células atraentes para aplicação em matrizes de suporte para regeneração óssea. [23] Apesar das vantagens, os osteoblastos são células presentes no osso em pequenas quantidades, por este motivo torna-se muitas vezes, melhor opção, utilizar células estaminais que possuem uma capacidade de proliferação e diferenciação elevada. [7]

De acordo com os estudos relatados anteriormente, que dizem respeito ao desempenho dos vários materiais, verifica-se que a incorporação de células nas matrizes de suporte, foi

também estudada e testada nesses estudos. De modo geral, demonstram que a incorporação destas células melhora a eficácia do tratamento de defeitos ósseos.

1.2. Engenharia de tecidos

Como referido anteriormente, o objetivo da ET é desenvolver biomateriais que mimetizem os tecidos biológicos nos quais serão aplicados. Assim, para o desenvolvimento de qualquer biomaterial para aplicação em ET, é de extrema importância conhecer o tecido no qual o biomaterial vai ser implantado, assim como a sua estrutura, as suas propriedades, e todos os processos biológicos que nele ocorrem.

1.2.1. Estrutura do osso

O osso é um órgão rígido que é responsável por suportar e proteger os restantes órgãos do corpo e ainda facilitar a mobilidade. O tecido ósseo constitui um compósito biocerâmico, constituído por uma fase mineral, uma fase orgânica e água. [6]

A estrutura óssea, está dividida em níveis de hierarquia, iniciando pelas plaquetas de hidroxiapatite orientadas nas fibrilas de colagénio; estas fibrilas estão posicionadas por camadas paralelas nas lamelas, sendo que as lamelas estão, concentricamente, em torno de vasos sanguíneos formando os ósteons. Por fim, os ósteons estão dispostos ao longo do osso, numa zona sólida, onde estão compactados, ou numa zona mais porosa do osso. Deste modo, estas duas zonas correspondem aos dois tipos de tecido ósseo: osso compacto e osso esponjoso. O osso compacto consiste em ósteons organizados de uma forma compacta e organizada, resultando numa matriz sólida. No interior das lamelas que constituem os ósteons, encontram-se os osteócitos, estes locais denominam-se lacunas. Entre os canais Haversianos e as lacunas, existem uns canais de menor dimensão, denominados canalículos, que fornecem passagem às células ósseas. Os canais Haversianos contêm no seu interior, vasos sanguíneos dispostos paralelamente ao eixo do osso, estes vasos estão interconectados aos restantes vasos até à superfície do osso, através de canais menores, os canais de Volkmann. O osso esponjoso, como o próprio nome indica, constitui uma estrutura menos densa, ele é constituído por trabéculas adjacentes às pequenas cavidades que contêm a medula óssea vermelha, na zona mais interior

do osso. As trabéculas têm um papel fundamental em termos de funções mecânicas do osso, funcionam como suporte do mesmo. [24] Na Figura 2 é possível observar a estrutura do osso, assim como os seus constituintes, descritos acima.

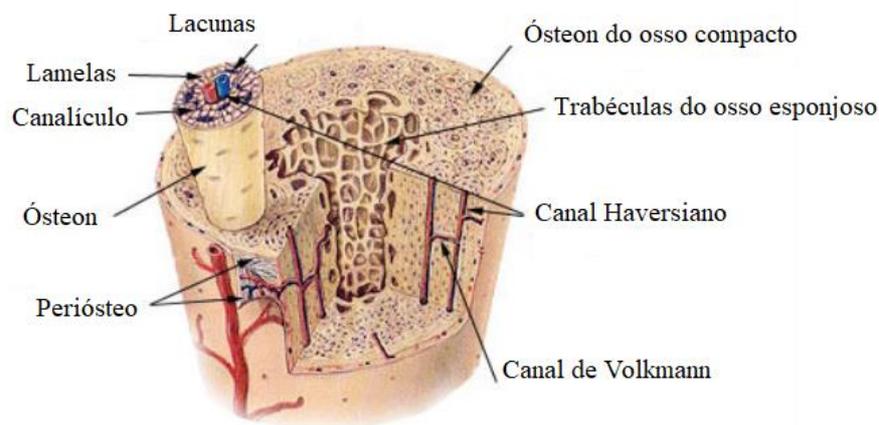


Figura 2 - Estrutura do osso (adaptado de [24]).

Analisada a estrutura do osso, é necessário ter em conta que a formação do mesmo ocorre por dois mecanismos distintos, a ossificação intramembranosa e a endocondral.

Na formação óssea intramembranosa, as células progenitoras mesenquimais diferenciam-se em osteoblastos que conduzem ao desenvolvimento de superfícies periosteais dos ossos longos, de algumas partes da mandíbula e ainda muitos dos ossos do crânio. Os osteoblastos migram para as membranas de tecido conjuntivo onde ocorre a deposição de matriz óssea, quando os osteoblastos se tornam células maduras e ficam rodeados de matriz óssea são designados osteócitos e estes são responsáveis pela secreção de substâncias responsáveis pela manutenção do osso. [24], [25]

Na ossificação endocondral, que ocorre na formação de ossos longos, as células progenitoras mesenquimais diferenciam-se em condrócitos, que proliferam e secretam ECM [21], formando assim um molde cartilaginoso (cartilagem hialina) para ocorrer a posterior mineralização e substituição por tecido ósseo por parte dos osteoblastos. Após a substituição total da cartilagem por matriz óssea, os osteoclastos são responsáveis por quebrarem parte do osso formado para gerar a cavidade medular. [24], [25]

É importante referir, que o processo de formação do osso, é um processo dinâmico que ocorre permanentemente, isto é, existe uma formação e destruição constante do osso, sendo este

processo denominado por remodelação ou metabolismo ósseo. O processo de remodelação óssea é dividido em duas fases: a osteólise, que consiste na reabsorção de tecido ósseo por osteoclastos e a osteogénese, a formação de tecido ósseo por parte dos osteoblastos. [25] Durante a primeira fase, células estaminais hematopoiéticas diferenciam-se em osteoclastos maduros para iniciarem a reabsorção do tecido ósseo danificado ou envelhecido, ocorre a diferenciação e a atividade dos osteoblastos é inibida por fatores expressos pelos osteoclastos. Na fase da osteogénese, após a reabsorção óssea estar completa, fatores expressos pelos osteoblastos suprimem a reabsorção, dando início à formação óssea através dos osteoblastos. Este ciclo de remodelação óssea repete-se constantemente ao longo do tempo, de modo a substituir tecido ósseo envelhecido ou danificado. [26]

1.2.2. Regeneração óssea

Depois de compreender a estrutura e o processo dinâmico de remodelação óssea, é também necessário entender os processos biológicos que ocorrem na cicatrização de fraturas, de modo a perceber que tipo de células estão envolvidas na recuperação estrutural e funcional do tecido ósseo.

No processo de cicatrização do osso, estão envolvidos quatro componentes, o córtex (parte superficial do osso), o periósteo, a medula óssea e os tecidos moles externos. Estes contribuem para a cicatrização a diferentes níveis, dependendo de determinados parâmetros existentes no tecido lesionado, entre eles, fatores de crescimento, hormonas, nutrientes, pH, níveis de oxigénio e estabilidade mecânica. [27] A cicatrização de fraturas ósseas, em termos histológicos clássicos, é dividida em duas, a primária ou direta e a secundária ou indireta.

A cicatrização direta, ocorre somente quando há redução anatómica dos fragmentos da fratura por fixação interna rígida e diminuição da tensão intrafragmentar. Neste processo existe uma tentativa por parte do córtex de restabelecer novos sistemas Haversianos, através da formação de unidades de reformulação, denominadas de cones de corte, com o intuito de repor a continuidade mecânica do osso. Neste processo as células osteoprogenitoras são fornecidas pelas células endoteliais vasculares e pelas células mesenquimais perivasculares, que posteriormente se tornam em osteoblastos. Na cicatrização direta, não é notada qualquer

resposta do periósteo, ou seja, não há formação de calos, apenas há remodelação do osso lamelar, dos canais Haversianos e dos vasos sanguíneos. [27]

A cicatrização indireta, é o mecanismo de cura da maioria das fraturas. Este processo consiste na combinação de ossificação endocondral e intramembranosa com a posterior formação de calo ósseo. [27]. Este tipo de cicatrização pode dividir-se em quatro estágios, sendo eles a formação de hematoma, seguida da formação de calo fibrocartilaginosa que leva à formação de calo ósseo e por fim a remodelação óssea. O primeiro estágio, tem início após ocorrer a fratura óssea, o hematoma surge devido ao rompimento dos vasos sanguíneos e do periósteo. Seguidamente ocorre a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo BMPs. Estas citocinas são responsáveis por atrair as células responsáveis pela remoção do tecido danificado e por secretar VEGFs que estimulam a cicatrização no local da fratura. Este estágio ocorre aproximadamente durante os primeiros 5 dias após a fratura. O segundo estágio, acontece do 5º ao 11º dia, em que os VEGFs conduzem ao processo de angiogénese, que inicia o desenvolvimento do novo tecido. Neste estágio, são também recrutadas MSCs que, pela ação das BMPs, são diferenciadas em fibroblastos, condroblastos e osteoblastos, iniciando-se a condrogénese que dá origem a uma rede fibrocartilaginosa nas extremidades da fratura, formando assim o calo fibrocartilaginosa. Em simultâneo, as células osteoprogenitoras depositam uma camada de tecido ósseo adjacente às camadas do periósteo. Segue-se a formação de calo ósseo até ao 28º dia. Esta inicia-se quando o calo cartilaginosa começa a sofrer ossificação endocondral, em que ocorre uma diferenciação complementar de condroblastos, condroclastos, osteoblastos e osteoclastos. Este processo provoca a reabsorção do calo cartilaginosa, conduzindo à sua calcificação. A deposição de tecido ósseo continua a decorrer assim como a proliferação dos vasos sanguíneos, possibilitando a migração de MSCs. No final deste estágio, verifica-se a formação de calo calcificado do osso recém-formado. O último estágio inicia-se no decorrer do penúltimo, por volta do 18º dia, e prolonga-se por tempo indeterminado, uma vez que a remodelação óssea é um processo permanente. O calo calcificado sofre constante remodelação devido à presença de osteoblastos e osteoclastos, que são responsáveis por manterem o equilíbrio entre produção e reabsorção de tecido ósseo, respetivamente. Este processo dá-se ao longo de vários meses, sendo que no final o centro do calo ósseo é substituído por osso compacto e a sua periferia por osso lamelar, resultando numa estrutura óssea regenerada. [28]

1.2.3. Requisitos das matrizes tridimensionais de suporte para regeneração óssea

Primeiramente, para aplicação em ET, em qualquer que seja o tecido alvo, todos os materiais para poderem ser usados como matrizes tridimensionais de suporte necessitam de cumprir determinados requisitos:

- **Biocompatibilidade:** as matrizes de suporte devem ser compatíveis com os tecidos e fluidos biológicos de modo a não promover respostas inflamatórias ou causar rejeição. Deve permitir a adesão e proliferação celular. Não só o material deve ser biocompatível, mas também todos os produtos de degradação do mesmo, não podem ser tóxicos ou criar respostas inflamatórias excessivas; [29]
- **Biodegradabilidade:** deve ser apropriada ao tecido alvo, isto é, deve apresentar uma taxa de degradação que acompanhe a regeneração do novo tecido. Os produtos de degradação das matrizes de suporte, têm também de ser degradáveis/metabolizáveis, por exemplo, por via enzimática ou via química, ou então serem excretados pelos mecanismos de excreção do corpo. [29]
 - Não cancerígenos. [30]
 - **Propriedades mecânicas:** idealmente, as matrizes de suporte devem apresentar propriedades mecânicas próximas, o quanto possível, das do tecido alvo. Para além disso, é necessário que possuam propriedades adequadas ao manuseamento, aquando da implantação. [29]
 - Mimetizar ao máximo a ECM. [30]
 - Permeabilidade ao oxigénio e a iões. [21]
 - **Porosidade elevada:** todos as matrizes de suporte devem possuir uma porosidade acima dos 90%, idealmente, compreendendo macro, e microporos, assim como interconectividade entre eles. Isto para possibilitar a difusão de nutrientes, fatores de crescimento, células e metabolitos, permitindo assim a vascularização do novo tecido e a formação da ECM por parte das células. A interconectividade entre poros, não só é importante para deixar chegar substâncias ao interior do material, mas também para

permitir a difusão de resíduos e produtos de degradação para serem expulsos do organismo. A variedade de tamanho de poros, tem de ser adequada ao tipo de células envolvidas, ou seja, tem de ser suficientemente grandes para permitir a migração das células para a matriz de suporte, mas suficientemente pequenos, para criar uma elevada área específica e permitir a adesão celular. [29]

De acordo com a aplicação da matriz de suporte, com o tecido alvo e com os processos de regeneração desse mesmo tecido, há requisitos mais específicos que têm de ser garantidos, para além dos requisitos gerais mencionados acima. No caso de matrizes de suporte para regeneração óssea, são necessários os seguintes requisitos:

- Osteoindução: é o processo de estimulação de células pluripotentes, primitivas e indiferenciadas, para se diferenciarem na linhagem de células produtoras de osso. É também definida como o processo que incita a osteogénese (formação de tecido ósseo). A osteoindução é uma propriedade necessária às matrizes de suporte, uma vez que, no processo natural de cicatrização de fraturas e de incorporação de implantes ela acontece, através das células mesenquimais indiferenciadas, que se transformam em pré-osteoblastos, constituindo o processo de osteoindução. [31] Matrizes de suporte que possuam um carácter osteoindutor, fornecem estímulos biológicos para induzir, recrutar, e diferenciar células estromais e mesenquimais indiferenciadas em pré-osteoblastos e osteoblastos. Exemplos de materiais osteoindutores, são por exemplo, os autoenxertos, a matriz óssea desmineralizada e algumas BMP's específicas. [23]

- Osteocondução: é a capacidade de promover o crescimento ósseo na superfície de um biomaterial ou na superfície dos seus poros. O crescimento ósseo na superfície das matrizes de suporte está dependente das células diferenciadas existentes, isto é, está dependente da osteoindução prévia, que proporcionou ou não, a diferenciação celular na linhagem de células produtoras de osso. Para além disso, a osteocondução só ocorre após a vascularização completa do biomaterial, o que significa que o processo de osteocondução, osteoindução e de angiogénese estão interligados. É também importante para este processo, a presença de fatores de crescimento que influenciam positivamente

a atividade mitogénica e a angiogénese. De notar, que o material utilizado na matriz de suporte, também tem influência na capacidade osteocondutora. [23], [31]

- Osteointegração: corresponde ao contacto direto entre o tecido ósseo e o *scaffold*, com ausência de formação de tecido fibroso na interface osso-matriz de suporte. Para ocorrer osteointegração, é necessário que ocorra previamente, osteoindução e osteocondução. Estes três requisitos estão interligados e estão inerentemente relacionados com os fatores de crescimento e todos são necessários em matrizes de suporte para regeneração óssea. [23], [31]

1.3. Biomateriais

Os materiais e dispositivos médicos utilizados nas áreas de ET e Medicina Regenerativa são denominados de biomateriais. Existem diversas definições para biomaterial, uma das mais recorrentes considera um biomaterial, qualquer material que possa estar em contacto com fluidos e tecidos biológicos. Para ser considerado biomaterial, é necessário cumprir determinados requisitos, nomeadamente, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade. Em suma, pode afirmar-se que a maioria dos requisitos necessários às matrizes de suporte (descritos anteriormente), coincidem com os requisitos essenciais para constituir um biomaterial. [4]

Na presente dissertação, os hidrogéis injetáveis desenvolvidos para aplicação em regeneração óssea, são à base de dextrano e gelatina.

1.3.1. Dextrano

O dextrano é um polissacarídeo bacteriano, constituído por unidades de α -D-glucopiranosose ligadas maioritariamente por ligações glicosídicas -1,6, no entanto apresenta algumas cadeias laterais unidas nas ligações -1,2, -1,3 e -1,4. Este polissacarídeo, tem uma presença assídua em aplicações biomédicas, sendo inicialmente utilizado como intensificador de fluxo periférico, expensor de volume plasmático e como agente antitrombolítico. O uso do dextrano neste campo, deve-se às suas características de boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, custo acessível e ainda, à facilidade de ser modificado quimicamente. Um dos

motivos pelo qual o dextrano se tornou um material de interesse, é o facto de ser proveniente de recursos renováveis e pela sua biocompatibilidade. O dextrano apresenta uma velocidade de degradação relativamente lenta por via enzimática comparativamente com outros polissacarídeos, o que o torna útil para transportar fármacos e proteínas, aumentando o seu tempo de vida na circulação sistémica. Para além destas aplicações, este polissacarídeo é também utilizado em técnicas de imagiologia *in vivo*. [17], [32]

O dextrano existe numa vasta gama de pesos moleculares, no entanto, a sua eliminação por parte do corpo humano varia consoante esse valor. Para pesos moleculares inferiores a 40 kDa o organismo elimina o dextrano através da depuração renal, tendo este um tempo de meia-vida de 8h, para pesos moleculares superiores a 40 kDa, o dextrano apresenta um tempo de meia-vida superior e a sua eliminação é feita através da retenção no fígado e posteriormente por ação de endo e exodextranases. De notar, que o dextrano é bastante solúvel em água e contém bastantes grupos hidroxilo ao longo da sua estrutura, pelo que, estas características tornam este polissacarídeo adequado para a formação de hidrogéis, na medida em que possui um carácter hidrofílico. Contudo, para poder formar um hidrogel é necessário que este seja reticulado, e graças aos grupos hidroxilo do dextrano, este pode sofrer modificação química, o que irá permitir a reticulação. [17]

1.3.2. Dextrano oxidado

Para a produção de hidrogéis a partir de dextrano, é necessário a introdução de grupos funcionais na estrutura deste polissacarídeo de modo a poder ser reticulado. Atualmente, existem diversos métodos de modificação do dextrano bem desenvolvidos e estudados, entre eles, a oxidação do dextrano através do periodato, que é um dos mais utilizados. Este método tem as vantagens de envolver uma reação livre de catálise, e permitir alcançar um produto purificado através de uma etapa simples de diálise, seguida de liofilização.

A presente dissertação, tem como via de modificação do dextrano, a oxidação com periodato de sódio, permitindo inserir grupos aldeído na estrutura do polissacarídeo. Os grupos aldeído podem reagir com grupos amina, hidrazida e hidroxilo, sem recorrer a iniciadores, o que é vantajoso para o processo de reticulação. Na estrutura do dextrano, num resíduo de glucose, estão presentes diois vicinais, tendo duas ligações suscetíveis à oxidação. Qualquer

uma dessas ligações, sendo oxidada, origina um grupo funcional aldeído no C_3 , sendo este ainda passível de sofrer uma segunda oxidação, devido à presença de grupos hidroxilo nos C_2 e C_4 . Nesta segunda oxidação, há formação de ácido fórmico (Figura 3), o que permite monitorizar facilmente a sua ocorrência, através da mudança de pH. [17]

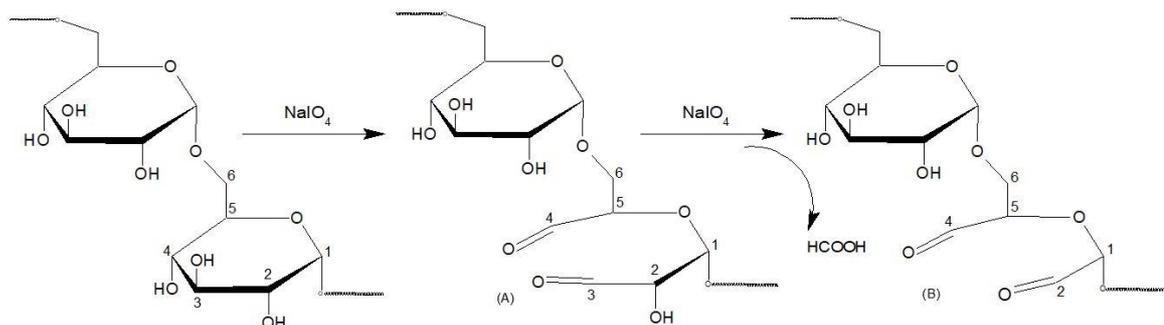


Figura 3 - Esquema representativo da oxidação do Dex através da reação com Periodato de Sódio. (A) Primeira oxidação, introdução dos grupos aldeídos no C_3 e no C_4 . (B) Segunda oxidação, introdução do grupo aldeído no C_2 e libertação de ácido fórmico.

Segundo dados da literatura, o dextrano depois de oxidado sofre algumas alterações nas suas propriedades físico-químicas, nomeadamente, o decréscimo da sua solubilidade em água e o aumento da sua viscosidade. Esta última, tem de ser controlada e ajustada para permitir que os hidrogéis formados tenham a injetabilidade adequada. Deste modo, o grau de oxidação (DO), torna-se um dos parâmetros importantes a determinar, pois tem influência nas propriedades finais do material, como por exemplo, na rigidez, na capacidade de absorção de água e na degradação. [17]

1.3.3. Gelatina

A gelatina é um dos biopolímeros mais utilizados em aplicações farmacêuticas/médicas, é obtida através da hidrólise do colagénio e, portanto, apresenta uma boa biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e boa afinidade com células. A gelatina pode ser proveniente de mamíferos ou de peixes, e, de acordo com a fonte e com as condições de processamento, as suas características variam. De um modo geral, a gelatina proveniente de mamíferos é a

preferível para estas aplicações e conseqüentemente, na Europa e na América do Norte a gelatina proveniente da pele de suínos é a mais produzida. [33]

Considerando o pré-tratamento que é feito para obter a gelatina, existem dois tipos de gelatina, tipo A e tipo B, ácido ou alcalino, respetivamente. O tipo A é o mais utilizado na área de ET devido às semelhanças com o colagénio original a nível dos aminoácidos na sua composição e porque possui um ponto isoelétrico (entre 7 – 9,4) que se aproxima do pH do organismo. [33] Para além das vantagens mencionadas para uso da gelatina em ET, existem algumas limitações, nomeadamente o facto de ela se dissolver a 37°C (temperatura fisiológica). No entanto, é possível contornar esta aspeto procedendo-se à modificação ou reticulação da mesma, que no caso do presente trabalho, se recorre a um processo de modificação com a introdução de grupos amina para posterior ligação com o dextrano (como se irá descrever mais adiante).

1.3.4. Gelatina modificada

A gelatina tipo A apresenta grupos amina e carboxilo (cargas positivas e cargas negativas, respetivamente) [34] na sua estrutura, que permitem realizar modificações químicas e serem reticulados. Os grupos amina existentes na estrutura original não são suficientes para formar estruturas firmes (testado e descrito na secção 2.2.4), ou seja, não possuem pontos de reticulação suficientes para formar um gel estruturado. Deste modo, à semelhança do dextrano, a Gel (gelatina) pode ser modificada, mas neste caso através dos grupos carboxilo, isto é, tornar os grupos carboxilo em grupos amina através da reação com ED (etilenodiamina) na presença de EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), que atua como intermediário ativando os grupos carboxilo através da formação da ligação éster, para posterior introdução de aminas primárias, originando ligações amida. Esta modificação permitirá que ocorra a reticulação entre os grupos aldeído do dextrano oxidado e os grupos amina da gelatina modificada (MGel). Na Figura 4 encontram-se a representação esquemática da modificação da gelatina.

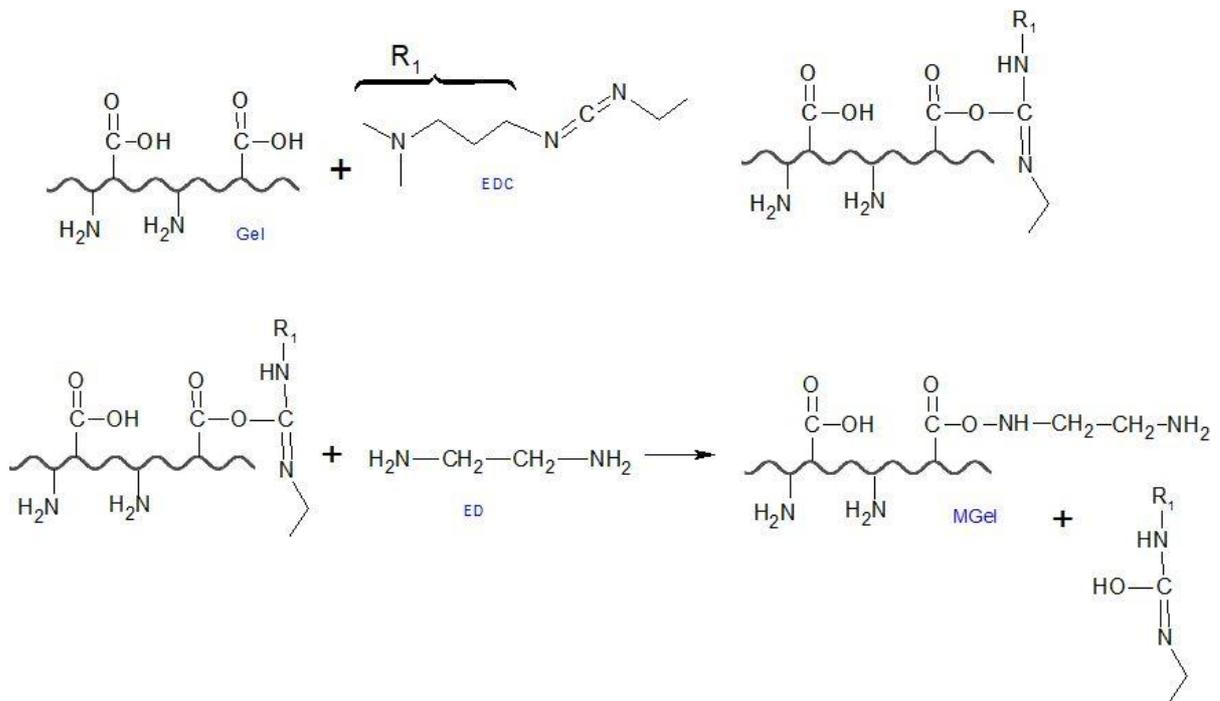


Figura 4 - Representação esquemática da modificação da Gel.

1.3.5. Nano hidroxiapatite (nHAp)

Como já foi referido anteriormente, as matrizes de suporte poliméricas necessitam, na maioria das vezes, de um reforço das suas propriedades mecânicas, que muitas vezes é atingido através da incorporação de um composto inorgânico na sua estrutura. A hidroxiapatite é uma forma natural de fosfato de cálcio e é o principal constituinte da parte inorgânica do osso e, portanto, é um dos compostos mais utilizados no reforço das propriedades mecânicas de matrizes de suporte poliméricas. [35] Este composto apresenta um rácio Ca/P de 1,67 e é um dos fosfatos de cálcio mais estáveis com baixa solubilidade em ambiente fisiológico. [36] Para além das vantagens que a hidroxiapatite tem, devido ao seu carácter inorgânico, esta apresenta excelente osteocondução e osteointegração o que é uma mais valia para aplicação em matrizes de suporte para regeneração óssea. Este mineral possui ainda macroporosidade ($>100 \mu\text{m}$) e interconectividade entre poros, o que permite a adesão, a proliferação e a diferenciação de células osteoprogenitoras e ainda a revascularização e crescimento de novo tecido ósseo. [6] Vários estudos da literatura confirmaram que a nHAp possui ainda mais benefícios devido ao

seu reduzido tamanho e à sua elevada área específica. Estas características promovem a adsorção de proteínas e de osteoblastos. [37] Na Figura 5 apresenta-se uma representação da estrutura química da nHAp.

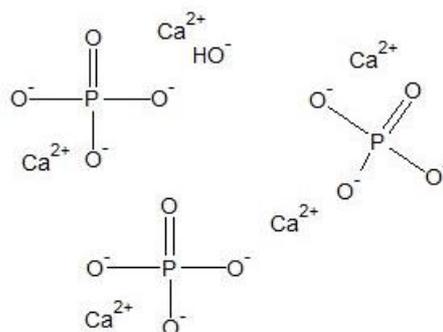


Figura 5 - Estrutura química da nHAp.

1.3.6. Fosfato tricálcico (β -TCP)

À semelhança da nHAp, os fosfatos de cálcio são compostos inorgânicos recorrentemente utilizados em ET ósseos devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, osteocondutividade e ao baixo risco de rejeição e infeção. [38] Para além disso, à semelhança da nHAp, eles apresentam bioatividade na medida em que, a presença dos iões cálcio e fosfato, estimulam a formação de minerais ósseos e também estimulam a expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica (p.e.: BMP's). Estes compostos têm ainda um papel importante na adsorção de proteínas na superfície da ECM. Todos estes fatores constituem um auxílio no processo de regeneração óssea. O fosfato tricálcico apresenta um rácio Ca/P de 1,50 e apresenta duas fases, α e β , no entanto o β -TCP apresenta uma estrutura mais estável e uma biodegradabilidade mais elevada, e por isso é a fase mais utilizada na área de regeneração óssea. Comparativamente à hidroxiapatite, por um lado o β -TCP é menos estável, por outro lado apresenta uma taxa de degradação mais rápida assim como solubilidade mais elevada. [36]

Na literatura encontram-se estudos do uso da hidroxiapatite e do β -TCP, tanto separadamente como em simultâneo, ambas as situações demonstram resultados satisfatórios

no processo de regeneração óssea. [36], [38] Na Figura 6 apresenta-se uma representação da estrutura química da β -TCP.

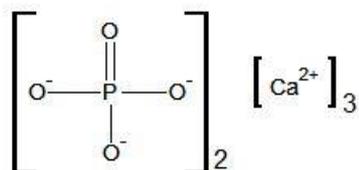


Figura 6 - Estrutura química do β -TCP.

1.4. Hidrogéis Injetáveis

Na área de ET, os hidrogéis desempenham um papel importante. Destacando os hidrogéis derivados de macromoléculas de origem natural, que devido à biocompatibilidade, à intrínseca interação celular e à degradação controlada por células, tornam-se excelentes opções para desenvolver matrizes de suporte capazes de guiar o crescimento de um novo tecido. Dentro do campo de ET, os hidrogéis são aplicáveis em diferentes vertentes, entre elas, cicatrização de tecido cartilaginoso, coberturas de feridas, mecanismos de transporte de fármacos e regeneração óssea, sendo este último o foco deste trabalho. [30] De modo geral, os hidrogéis proporcionam a migração celular, o processo de angiogénese e, devido ao elevado teor de água trazem vantagens na difusão de células, produtos de degradação e nutrientes. Este tipo de estruturas é ainda aliciante na medida em que é possível controlar a sua porosidade, a sua degradação e a sua capacidade de inchaço (*swelling*), de forma adaptativa, relativamente à sua aplicação. [21] [30]

Uma das questões associadas à utilização de matrizes de suporte em ET, é a necessidade de recorrer a procedimentos cirúrgicos invasivos e por vezes complexos. O conceito de hidrogéis injetáveis tem em vista conseguir contornar esse problema, podendo proporcionar um procedimento mais rápido, praticamente não invasivo, menos doloroso e evitar feridas e cicatrizes operatórias. Além disso, os hidrogéis injetáveis apresentam outros benefícios como a diminuição do risco de infeções, a facilidade de adaptação à morfologia do defeito a preencher

e a capacidade de incorporar substâncias bioativas e células no material, antes de ser injetado *in situ*, combatendo as dificuldades de propagação e adesão celular. [5]

O desempenho dos hidrogéis está dependente de diversos fatores, nomeadamente do controlo das suas propriedades, que podem ser ajustadas de acordo com as necessidades do tecido alvo. Deste modo, propriedades como a natureza química da estrutura do material, a densidade de reticulação, a estabilidade à oxidação, a degradação enzimática e a hidrólise, a presença de grupos funcionais para possível funcionalização, a porosidade e a orientação dos poros, as propriedades viscoelásticas (mimetizando a ECM) e ainda a sensibilidade ao pH e à temperatura, devem ser ajustadas e controladas para otimizar o desempenho do material. [21] No entanto, no caso particular de hidrogéis injetáveis, existem determinadas especificidades que devem ser cumpridas para que um hidrogel possa ser utilizado por via de injeção, e consequentemente formação do gel *in situ*.

1.4.1. Requisitos dos hidrogéis injetáveis

Para que um hidrogel possa ser considerado e utilizado como um injetável, existem alguns requisitos a cumprir, e algumas propriedades a ser ajustadas de acordo com o método de administração/implantação do material, tais como:

- Injetabilidade: para que a formação do gel ocorra *in situ* após injeção, é necessário garantir que as soluções tenham injetabilidade adequada, isto é, a solução deve escoar através da seringa até ser injetada e deve gelificar logo após injeção, de modo a que o hidrogel preencha o defeito em questão. Esta propriedade pode ser ajustada manipulando alguns fatores como a concentração, viscosidade e a taxa de gelificação, tendo este último especial importância, uma vez que o processo de gelificação deve ser brando para não causar danos nos tecidos que rodeiam o defeito a tratar, além disso, taxas de gelificação muito rápidas podem comprometer a difusão do material até preencher o defeito enquanto que taxas de gelificação muito lentas, pode prejudicar a integridade do hidrogel, e ainda causar espalhamento do mesmo para locais indesejáveis. [5]

- Citotoxicidade: tal como em todos as matrizes de suporte e dispositivos médicos, os hidrogéis injetáveis devem ser não tóxicos antes, durante, e depois da injeção do material. Os produtos de degradação do hidrogel têm também de ser não tóxicos e não provocar respostas inflamatórias. Ainda relativamente ao processo de gelificação, este não deve atingir temperaturas elevadas para não provocar necroses térmicas nos tecidos circundantes da lesão. [5]

- Propriedades mecânicas: os hidrogéis devem possuir uma resistência mecânica adequada, depois da gelificação, para conseguirem suportar a carga biomecânica e as células que vão promover a formação do novo tecido. No caso particular do osso, sendo este um tecido duro, a resistência do mesmo apresenta um valor muito distinto dos tecidos moles, pelo que, este é um dos parâmetros mais exigentes de atingir. Estas propriedades estão dependentes de vários fatores como a rigidez das cadeias poliméricas, do tipo de agentes reticulantes e sua concentração e da capacidade de inchaço que está diretamente relacionada com a hidrofiliabilidade do material, que lhe confere um caráter mais viscoelástico. A rigidez e a tenacidade são parâmetros mecânicos importantes nos hidrogéis injetáveis. Estes devem ter rigidez suficiente de forma a proporcionar uma estrutura estável para as células e para a formação de novo tecido e devem ter a tenacidade apropriada para evitar que o material se torne quebradiço e comprometa a sua função. Assim, para uma *performance* adequada do material, deve existir um balanço entre estes dois parâmetros. [5]

- Degradação: de modo geral, os hidrogéis sofrem degradação através de mecanismos como dissolução, hidrólise ou degradação enzimática. Para além disso, por vezes a atividade celular pode também intervir na degradação do material. Idealmente, o que se pretende é que a taxa de degradação acompanhe a taxa de formação do novo tecido. Para tal é necessário ajustar fatores como a densidade de reticulação, o peso molecular, a morfologia do material, a porosidade e a sua interconectividade. A manipulação destes fatores deve ser feita de modo a conseguir obter uma taxa de degradação o mais próxima possível da taxa de regeneração do tecido alvo. [5]

1.5. Liberação de fármacos

A eficiência da administração de fármacos é, na maioria das vezes, reduzida no sentido em que grande parte da dose administrada não atinge o local alvo, devido a processos de metabolização e excreção que ocorrem naturalmente no organismo. Sendo assim, um dos parâmetros relacionados com a administração de fármacos é a chamada biodisponibilidade, que diz respeito à quantidade de fármaco inalterado que efetivamente atinge o local da lesão. Deste modo, os sistemas de liberação controlada (SLC) pretendem reduzir essa perda de fármaco, aumentar a sua biodisponibilidade, manter a concentração do fármaco aproximadamente constante evitando múltiplas administrações e ainda evitar que o fármaco cause efeitos secundários em tecidos não alvo, atuando apenas no local desejado. De um modo geral, os SLC têm como objetivo controlar a liberação e a concentração da substância bioativa no tempo e no espaço, para maximizar os seus efeitos terapêuticos. [21]

Os SLC têm sido utilizados cada vez mais nas áreas de ET e Medicina Regenerativa, visto que as matrizes de suporte possuem a capacidade de incorporação de fármacos, proporcionando condições seguras para o mesmo e possibilitam a liberação controlada ao longo do tratamento. [39] Para desenvolver um SLC é necessário ter em conta alguns aspetos como as propriedades físico-químicas, a farmacocinética e a farmacodinâmica do fármaco, as propriedades do material onde será incorporado, os métodos de produção e as barreiras fisiológicas e bioquímicas a que o fármaco irá estar exposto. [40]

Os SLC podem ser concebidos através de diversos métodos de incorporação de fármacos, tais como, mistura (*blend*), modificação de superfície, incorporação por absorção, incorporação através de *electrospinning* e conjugação do polímero e do fármaco (pró-fármaco). [39] Na utilização de hidrogéis como SLC, o método mais simples de incorporar o fármaco é a mistura, em que o fármaco fica dissolvido ou disperso na solução polimérica. No entanto, para proporcionar melhores resultados, pode não ser o mais adequado. Muitas vezes para controlar melhor a sua liberação a solução como pró-fármaco é mais vantajosa.

A liberação controlada de fármacos pode ocorrer por diversos mecanismos. Estes encontram-se sumarizados no esquema da Figura 7. A informação presente neste esquema encontra-se descrita na literatura. [40]

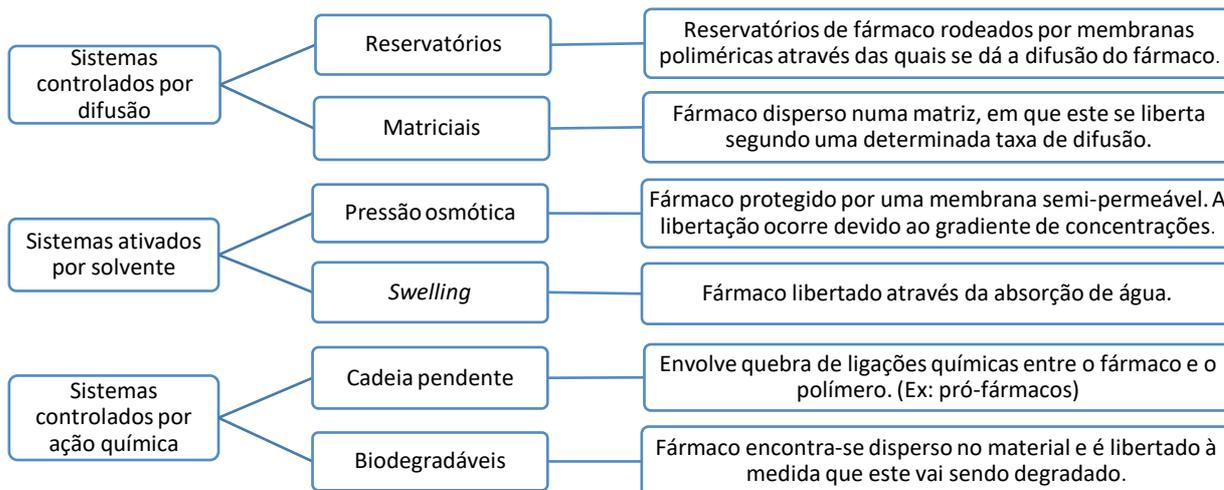


Figura 7 - Mecanismos de libertação de fármacos.

De notar que, na prática, os SLC não têm um mecanismo de libertação único, isto é, muitas vezes, ocorre a libertação do fármaco através de vários mecanismos em simultâneo. No caso particular dos hidrogéis, ocorre difusão e ao mesmo tempo ocorre libertação por absorção de água (*swelling*) devido à capacidade que estes têm de absorver grandes quantidades de água e pode ainda ocorrer libertação à medida que a matriz polimérica sofre degradação.

1.5.1. Vancomicina

A vancomicina (Figura 9) é um fármaco antibiótico glicopeptídico tricíclico com atividade bactericida contra diversas bactérias Gram-positivas, em particular a *staphylococcus aureus* resistente à metilina. [41], [42] Esta é uma das maiores causas de infeções ósseas, portanto, a vancomicina, é bastante usada em matrizes de suporte e

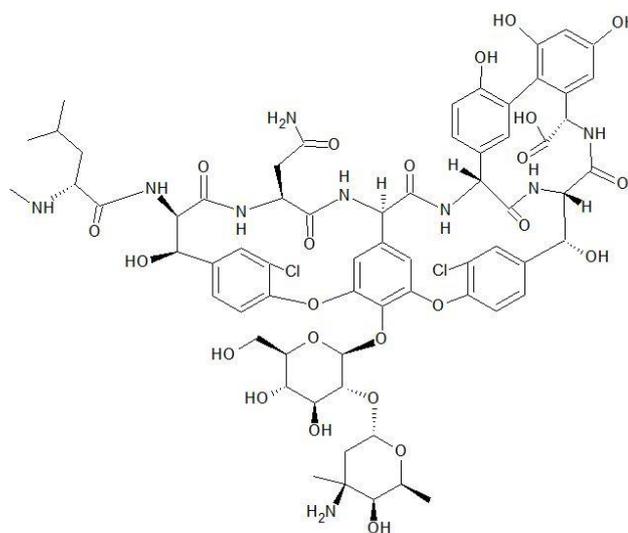


Figura 8 - Estrutura química da vancomicina.

sistemas de libertação controlada para aplicação em tecidos ósseos, como é possível comprovar na literatura. [42], [43], [44]

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Os materiais que foram utilizados ao longo do trabalho laboratorial na produção e caracterização dos hidrogéis para regeneração óssea encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Informação dos materiais utilizados e respectivas aplicações.

Material	Fornecedor	Informação adicional	Aplicação
Dextrano	<i>TCI</i> (Tokyo Chemical Industry)	Mw =70000	Polímero para hidrogéis
Periodato de Sódio	<i>Fisher Scientific</i> (U.K.)	99% pureza	Agente oxidante
Ácido tricloroacético	<i>Sigma-Aldrich</i> ®	≥ 99,5 % pureza	Soluções para determinação do grau de oxidação
Carbazato de tert-butilo (tBC)	<i>TCI</i> (Tokyo Chemical Industry)	> 97 % pureza	Determinação do grau de oxidação
Dietilenoglicol	<i>Chem-Lab</i> (Bélgica)	> 99 % pureza	Reagente para parar a reação de oxidação do Dextrano
Ácido adípico dihidrazida (AAD)	<i>TCI</i> (Tokyo Chemical Industry)	> 99 % pureza	Reticulante
Membrana de diálise	<i>Medicell Membranes Ltd</i>	MWCO – 12-14000 Daltons	Diálise
Cloreto de sódio (NaCl)	<i>Panreac</i>	99,5 % pureza	Solução PBS
Cloreto de potássio (KCl)	<i>Sigma-Aldrich</i> ®	≥ 99 % pureza	Solução PBS

Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	<i>José Manuel Vaz Pereira</i> (Lisboa, Portugal)	-	Solução PBS
Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)	<i>José Manuel Vaz Pereira</i> (Lisboa, Portugal)	-	Solução PBS
Hidróxido de sódio (NaOH)	<i>José Manuel Gomes dos Santos</i>	99 % pureza	Solução PBS
EDC (Cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida)	<i>TCI</i> (Tokyo Chemical Industry)	> 98 % pureza	Agente ativador de grupos carboxilo
Gelatina	<i>Sigma-Aldrich</i> ®	Gel strength 300, tipo A	Polímero para hidrogéis
Etilenodiamina	<i>Acros Organics</i>	99% pureza	Modificação da gelatina
Vancomicina	<i>Hikma</i>	-	Fármaco para incorporação
Fosfato tricálcico (β -TCP)	Cedido pela empresa <i>Artur Salgado, S.S.</i>	-	Composto inorgânico para incorporação na matriz de suporte
Nano Hidroxiapatite (nHAp)	Cedido pela empresa <i>Artur Salgado, S.S.</i>	-	Composto inorgânico para incorporação na matriz de suporte

2.2. Procedimento

O procedimento laboratorial que foi realizado para iniciar o trabalho prático teve como ponto de partida alguns artigos científicos sobre síntese de hidrogéis à base de dextrano e de gelatina. [17], [18]

2.2.1. Oxidação do Dextrano

O procedimento laboratorial iniciou-se com a oxidação do dextrano (Dex), para tal, fez-se reagir o Dex com periodato de sódio, de modo a introduzir os grupos funcionais aldeído, para posterior síntese dos hidrogéis. [17] Esta etapa deu início com a preparação de uma solução aquosa de Dex, onde se dissolveram 2 g de Dex em 28 mL. Seguidamente preparou-se a solução aquosa do agente oxidante, dissolvendo 0,64 g de periodato de sódio em 15,8 mL. Estas proporções têm por base informação da literatura, para obter DexOx (Dextrano Oxidado) com um grau de oxidação (*degree of oxidation* – DO) de 25%. [45] A solução de periodato de sódio foi adicionada à solução de Dex, gota a gota, durante 20 min, e deixou-se reagir durante 24 h à temperatura ambiente e na ausência de luz. Ao fim das 24 h foi adicionado ao meio reacional dietilenoglicol, em quantidades equimolares, de modo a parar a reação. O produto obtido após a reação designa-se por DexOx.

Após obter o DexOx procedeu-se à purificação do mesmo, através de um processo de diálise com uma duração de 3 dias e posterior liofilização. No processo de diálise foram utilizadas membranas de diálise onde se colocou o DexOx obtido. Depois, as membranas foram colocadas num recipiente com água destilada e esta foi mudada 2 a 3 vezes por dia, de modo a promover o gradiente de concentração. Este processo pretende remover o subproduto proveniente da segunda oxidação do Dex (ácido fórmico), impurezas, vestígios de periodato de sódio não reagido e dietilenoglicol. Terminada a etapa de diálise, o DexOx foi colocado em tubos *Falcon* que foram congelados. Por fim, as amostras foram liofilizadas para remover a água presente nas mesmas. O esquema da Figura 9 ilustra os passos deste processo. [17]

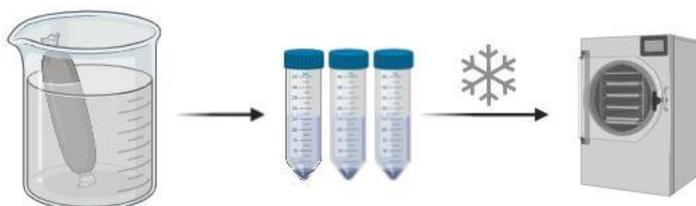


Figura 9- Esquema representativo do processo da diálise à liofilização.

2.2.2. Determinação do grau de oxidação

A determinação do grau de oxidação foi feita através da utilização do Carbazato de tert-butilo (tert-butylcarbazate - tBC). Sendo que o DexOx apresenta grupos aldeído na sua estrutura e o tBC apresenta grupos carbazato, estes últimos reagem com grupos aldeído para formar carbazonas. Assim, é possível determinar o DO através deste método. A reação entre o DexOx e o tBC iniciou-se com a preparação de uma solução de DexOx (0,5 mL; 1% (m/v)) e uma solução de tBC (0,5 mL; 0,03 M), ambas em ácido tricloroacético (1% (m/v)). Seguidamente fez-se reagir 0,5 mL de cada uma destas soluções durante 24 h à temperatura ambiente. [17] Após fazer reagir DexOx com tBC, foi preparada uma solução para a análise de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), que permitirá determinar o grau de oxidação do DexOx. Este processo é descrito na secção referente ao método de RMN (secção 2.3.1.1).

Como já foi referido na secção 1.3.2, o Dex é passível de sofrer uma dupla oxidação. Desse modo é necessário determinar o DO correspondente. Uma vez que há libertação de ácido fórmico quando esta ocorre, é possível determinar a quantidade libertada deste ácido, através de uma titulação com NaOH. Aquando da oxidação do Dex, antes da adição do dietilenoglicol, foram retirados 5 mL da solução e reservados para realizar a titulação. Preparou-se uma solução de NaOH (0,01M) e realizou-se a titulação utilizando uma solução de fenolftaleína como indicador.

2.2.3. Síntese dos Hidrogéis DexOx/AAD

Após a introdução dos grupos aldeídos na estrutura do Dex, este está apto para ser reticulado com o AAD. A reticulação química acontece devido à formação de base *Schiff*, [17], [46] através da reação dos grupos aldeído com os grupos hidrazida do AAD, formando assim ligações hidrazona, como se observa na Figura 10.

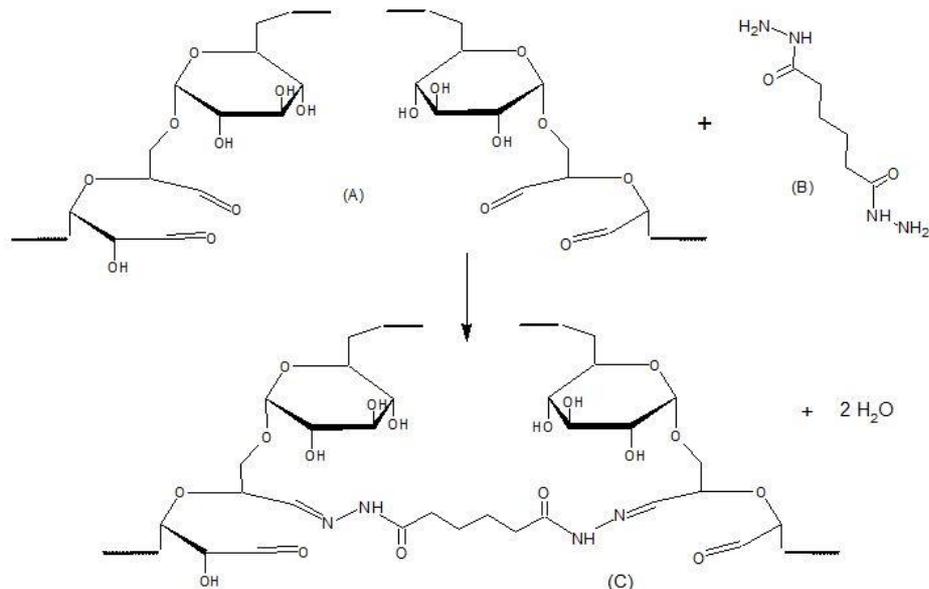


Figura 10 - Reticulação do DexOx com AAD. (A) DexOx. (B) AAD. (C) DexOx reticulado, formação da ligação hidrazona.

Primeiramente preparou-se uma solução de DexOx (20% (m/v)) em PBS (pH 7,4) (Anexo A), e colocou-se num banho a 37 °C até dissolver completamente. Seguidamente preparou-se a solução do agente reticulante, AAD, (10 % e 20 % em base molar tendo em conta o número de resíduos de glucose no Dex original), esta concentração foi determinada através da equação (1), em que $Mw_{Res\ Glu}$ é a massa molar do resíduo de glucose no Dex original, m_{DexOx} é a massa utilizada na solução de DexOx, Mw_{AAD} é a massa molar do AAD e V é o volume de água destilada utilizado na preparação da solução de DexOx. [17]

$$[AAD] = \frac{m_{DexOx} \cdot 0,1 \cdot Mw_{AAD}}{Mw_{Res\ Glu} \cdot V} \quad (1)$$

Tendo as soluções preparadas, retiraram-se 250 μL da solução de DexOx e transferiram-se para uma placa de 24 poços, e misturaram-se 250 μL da solução de AAD deixando reagir durante a noite à temperatura de 37 °C, como está representado na Figura 11. [17] Para além da junção do DexOx com o AAD, foram também misturados os inorgânicos (β -TCP e nHAp, ambos a 1% (m/v)) na solução de DexOx. Na Tabela 2 estão sumariadas as composições dos hidrogéis que foram preparados, tendo variado a quantidade de reticulante e a presença dos inorgânicos, de modo a avaliar a influência dos mesmos.

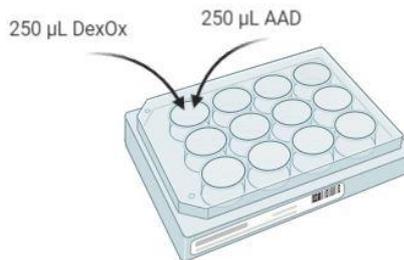


Figura 11 -Esquema da preparação dos hidrogéis.

Tabela 2 - Composições dos hidrogéis de DexOx e AAD.

Composição dos hidrogéis	
	AAD (10%)
	AAD (20%)
	AAD (10%)
	β -TCP (1% (m/v))
Dex (20% (m/v))	AAD (10%)
	nHAp (1% (m/v))
	AAD (20%)
	β -TCP (1% (m/v))
	AAD (20%)
	nHAp (1% (m/v))

2.2.4. Modificação da Gelatina

Inicialmente, testou-se a possibilidade de produzir hidrogéis de DexOx com a Gel (Gelatina), através da reticulação entre os grupos aldeído do DexOx e os grupos amina da Gel, sem ser necessário modificar a gelatina. Esta possibilidade traria vantagens na medida em que, menos reagentes seriam envolvidos no procedimento e os utilizados seriam os dois, de base natural sem qualquer modificação. No entanto verificou-se que juntando apenas o DexOx e a

Gel diretamente estes formaram um líquido muito viscoso, mas não se conseguiu obter uma estrutura firme e formar um hidrogel. Isto deve-se aos grupos amina existentes na Gel original não serem suficientes. Para além disso, teriam outro problema associado, pois os hidrogéis gelificam a 37 °C (temperatura fisiológica) e a essa temperatura a Gel não gelifica na totalidade sendo que corresponde à temperatura de transição sol-gel. Tendo em conta a não viabilidade dos hidrogéis DexOx/Gel procedeu-se à modificação da gelatina tendo como ponto de partida dados da literatura. [18]

O processo realizado para modificar a Gel, apresenta semelhanças com o processo de oxidação do dextrano. Inicialmente preparou-se uma solução aquosa de Gel (5% (m/v), 100 mL, que se manteve em agitação a 60 °C até dissolver. Seguidamente adicionaram-se 16 mL de ED, e baixou-se o pH com a adição de HCl (0,1 M) e por fim adicionaram-se 2,3g de EDC. A mistura foi deixada em agitação a reagir, durante aproximadamente 20 h à temperatura ambiente. Na Figura 12 encontra-se uma representação esquemática da síntese da MGel.

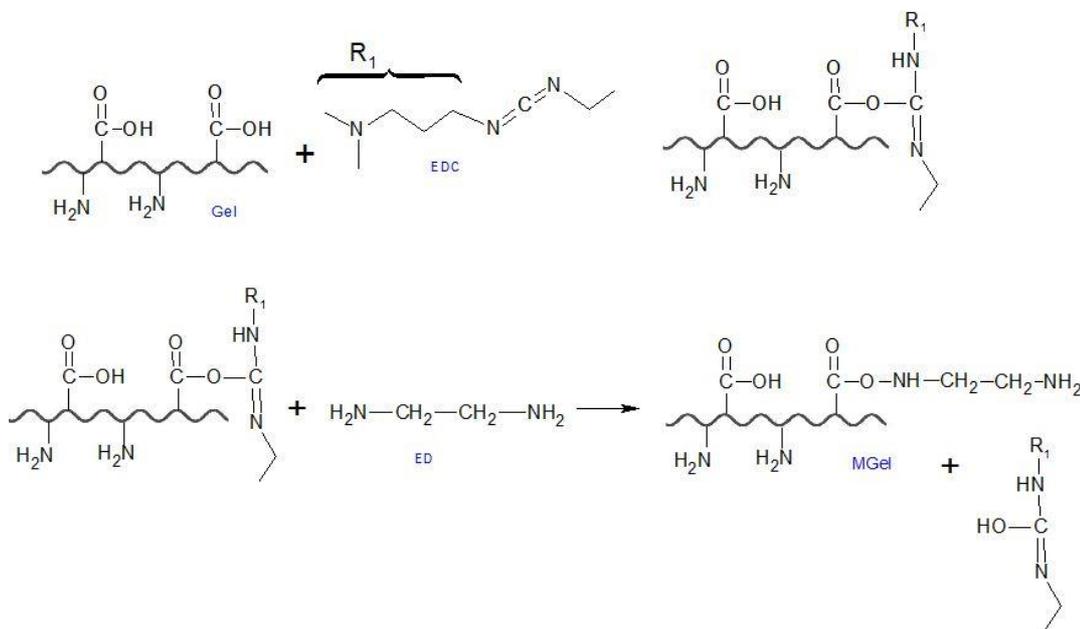


Figura 12 - Representação esquemática da MGel.

Após a Gel estar modificada é necessária uma etapa de purificação de modo a remover o excesso de ED, de EDC e impurezas. Este processo foi conseguido através de uma etapa de diálise, tal como no caso do DexOx e encontra-se descrito anteriormente. As condições e a

membrana utilizadas para a Gel foram as mesmas que no caso anterior. Terminada a etapa de diálise, a solução de MGel (Gelatina modificada) foi colocada em tubos *Falcon* que foram congelados e posteriormente liofilizados para obter a MGel. A Figura 9 representa igualmente as etapas de purificação da MGel. [18]

2.2.5. Síntese dos Hidrogéis DexOx/MGel

Após a síntese da MGel e do DexOx, foi possível prosseguir com a síntese dos hidrogéis DexOx/MGel. No caso destes hidrogéis a reticulação foi feita entre os grupos aldeído do DexOx e os grupos amina da MGel, dando origem a ligações imina. Na Figura 13 encontra-se uma representação esquemática da reticulação dos hidrogéis DexOx/MGel.

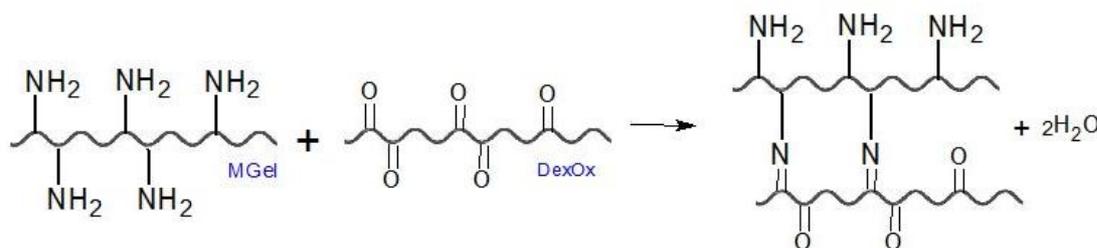


Figura 13 - Representação esquemática da reticulação da MGel e do DexOx.

Para produzir estes hidrogéis, preparou-se uma solução de MGel (20% (m/v)) e uma solução de DexOx (10% (m/v)), ambas em PBS (pH 7,4). Seguidamente, em placas de poços foram misturadas as duas soluções. Segundo dados da literatura os hidrogéis de DexOx/MGel apresentam um balanço favorável entre propriedades mecânicas e boa interação, aquando misturadas em proporções 5/5 (m/m) dos dois constituintes. Enquanto que para rácios de 6/4 e 7/3 (m/m) de DexOx/MGel verificaram-se melhores propriedades mecânicas e uma menor interação célula-material. [18] Deste modo as primeiras amostras foram preparadas em proporções iguais. Para além das misturas de MGel e DexOx, foram adicionados os compostos inorgânicos (β -TCP e nHAp, ambos a 1% (m/v)) na solução de DexOx, e misturadas com a

MGel posteriormente. Na Tabela 3 estão sumariadas as várias composições dos hidrogéis que foram preparados, com e sem presença de inorgânicos.

Tabela 3 - Composição dos hidrogéis produzidos com MGel.

Composição dos hidrogéis	
	Dex (10% (m/v))
	Dex (10% (m/v))
MGel (20% (m/v))	β -TCP (1% (m/v))
	Dex (10% (m/v))
	nHAp (1% (m/v))

Após a formulação dos hidrogéis, verificou-se que não ocorreu gelificação a 37 °C e a gelatina oxidou ganhando uma tonalidade amarela. Deste modo testaram-se os restantes rácios e um DexOx com um DO maior para verificar se ocorria gelificação de modo a formar uma estrutura firme.

2.3. Caracterização

Depois de produzidos os hidrogéis, é necessário caracterizá-los, de modo a confirmar se apresentam a sua síntese e verificar se apresentam as propriedades desejadas para a aplicação em vista.

2.3.1. Caracterização química

2.3.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN é uma técnica analítica utilizada para a análise de compostos e de estruturas moleculares, e permite também a observação direta de reações químicas. [47] Esta técnica tem por base a absorção de radiação eletromagnética e permite observar e medir a interação de *spins* nucleares quando sujeitos a um campo magnético. [48]

No presente trabalho foi realizada a Ressonância magnética Nuclear de Protão (^1H -RMN) que consiste na técnica de RMN aplicada em relação aos núcleos de hidrogénio.

O ensaio de ^1H -RMN foi realizado no Espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz, a 25 °C, com uma sonda de deteção tripla TXI de 5mm. O sinal a 4,8 ppm, foi eliminado por supressão do solvente com desacoplamento. O poder de desacoplamento foi ajustado a um nível de forma a que a intensidade do protão anomérico não fosse afetada.

Para a realização desta técnica foram preparadas soluções com concentrações adequadas para a análise de RMN de DexOx reagido com tBC. Para a análise do DexOx reagido com tBC foram utilizados tubos de parede fina e preparadas soluções de 11 mg de amostra em 1 mL de solvente. O solvente utilizado foi água deuterada (D_2O). Esta técnica apenas foi aplicada ao DexOx e DexOx reagido com tBC, pois esta etapa destina-se à caracterização química dos mesmos e à determinação do DO do DexOx.

2.3.1.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)

FTIR é uma técnica de espectroscopia utilizada para caracterizar compostos químicos, através da análise qualitativa das ligações químicas e das estruturas moleculares dos mesmos. Esta análise tem por base as vibrações das ligações químicas, às quais correspondem frequências específicas, permitindo assim a identificação de compostos químicos.

A componente ATR permite realizar uma análise não destrutiva e mais fácil, na medida em que, não é necessária uma preparação característica da amostra, podendo ser analisada no seu estado original. Isto é possível, uma vez que com ATR são medidas as alterações no feixe de luz que é refletido quando incide na amostra. [49]

As análises de FTIR-ATR foram realizadas num espectrofotómetro Bruker Tensor 27. Os espetros obtidos foram efetuados com 64 *scans*, com uma resolução de 400 cm^{-1} , na gama de espetro $550\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Esta técnica foi aplicada aos hidrogéis produzidos, assim como aos compostos químicos que os constituíam (dextrano, DexOx, AAD, Gel, MGel, β -TCP e nHAp).

2.3.2. Capacidade de Inchaço

De modo a avaliar a capacidade de inchaço dos hidrogéis, após gelificação a 37 °C, durante a noite, estes foram congelados e posteriormente liofilizados. A etapa de liofilização é necessária uma vez que durante a reticulação dos hidrogéis, há libertação de água e, portanto, no final da gelificação o hidrogel já absorveu essa mesma água. Isto impossibilita obter o peso do hidrogel inicial (sem presença de água), portanto, após liofilizados os hidrogéis foram pesados (m_i) colocados em *buffers* a uma temperatura de 37 °C durante 24 h para possibilitar o inchaço e posteriormente pesados (m_f). No organismo humano ocorrem variações de pH de acordo com o estado de saúde, com o tipo de tecidos vivos, entre outros fatores. Deste modo, os hidrogéis foram colocados em buffers com diferentes valores de pH (2; 5; 7,4 e 9) O rácio de capacidade de inchaço (*swelling ratio* - S_r) foi calculado através da equação 2. [12]

$$S_r = \frac{m_f - m_i}{m_i} \quad (2)$$

2.3.3. Estudos de degradação

Terminada a etapa de absorção de água/inchaço os hidrogéis foram colocados nos mesmos buffers com diferentes valores de pH (2; 5; 7,4 e 9), a 37 °C permitindo avaliar a influência deste parâmetro na degradação dos hidrogéis. Os hidrogéis foram removidos dos buffers, sendo retirado o excesso de líquido da sua superfície e pesados diariamente (m_t) (os buffers foram repostos a cada pesagem). As pesagens foram feitas até os hidrogéis se desintegrarem, isto é, a sua recolha para a pesagem estar impossibilitada devido ao estado de degradação.

2.3.4. Incorporação do fármaco na matriz de suporte e sua libertação

A vancomicina é um fármaco muito utilizado para tratamento de infeções ósseas, como referido anteriormente.

De acordo com a aplicação em vista dos hidrogéis produzidos, a incorporação do fármaco tem de ser efetuada antes da etapa de gelificação, visto que esta ocorre *in situ*. Deste

modo, para incorporar o fármaco no material optou-se pelo método de mistura, que se baseia na introdução do fármaco nas soluções que formam o hidrogel. Assim, o fármaco fica incorporado na matriz tridimensional do hidrogel tal como esquematizado na Figura 14.

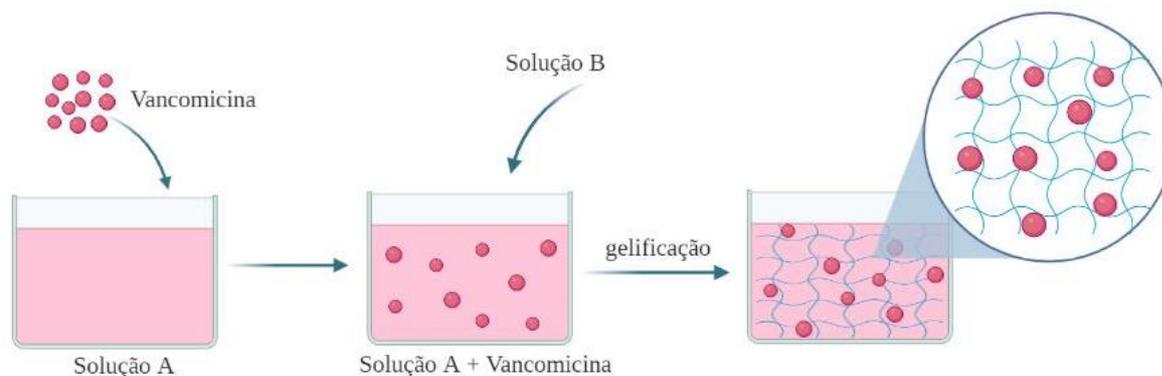


Figura 14 - Representação esquemática da incorporação do fármaco na matriz de suporte. Solução A e B representam as soluções que formam o hidrogel.

A vancomicina é normalmente utilizada para tratamento por via intravenosa (15 a 20 mg/kg peso corporal a cada 8 a 12h), e neste sentido, é fornecida em frascos de vidro selados com rolhas de borracha e cápsulas de alumínio, e fechados com uma tampa de plástico tipo *flip-off*. Estes frascos contêm a vancomicina liofilizada sob forma de um pó homogêneo e de acordo com as indicações do fabricante, no frasco de 1 g de vancomicina devem ser adicionados 20 mL de água miliQ para reconstituição da solução. Assim obtém-se uma solução de vancomicina a 5% (m/v).

A solução de vancomicina tem de ser adicionada a um dos constituintes dos hidrogéis, portanto, é necessário perceber a qual das soluções, DexOx ou AAD, será adicionada a solução do fármaco. Depois de analisadas as estruturas químicas dos vários constituintes, decidiu-se preparar as soluções de DexOx, e de DexOx com os inorgânicos do mesmo modo que na secção 2.2.3, e juntar a vancomicina e o AAD na mesma solução. Tendo em conta a existência de grupos aldeído na estrutura do dextrano e de grupos amida na estrutura da vancomicina, optou-se por juntar a vancomicina ao AAD que apenas apresenta grupos amina nas suas extremidades. Esta escolha teve como objetivo evitar qualquer reação/reticulação antecipada.

Primeiramente foram preparadas amostras de acordo com as composições anteriores (secção 2.2.3. Tabela 2) e foi adicionada a solução de vancomicina a 5% (m/v) (250 µL) à solução do reticulante. As amostras de hidrogéis foram colocadas a 37 °C para gelificar e após esta etapa as amostras foram retiradas da placa de poços e colocadas em *vials* com 10 mL de PBS (pH 7,4), na estufa a 37 °C. Cada amostra continha 12,5 mg de Vancomicina.

Para obter o perfil de libertação do fármaco, recorreu-se a um espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-550, com o software *Fixed Wavelength Measurement*, em que através da medição da absorvância consegue-se saber a concentração de fármaco no líquido sobrenadante de cada amostra. A relação entre a absorvância e a concentração de fármaco é obtida através de uma curva de calibração com soluções padrão de vancomicina (estes dados estão apresentados no Anexo B). As medições foram realizadas nos tempos: 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 d e 14 d, 21 d, retirando 1,5 mL do líquido sobrenadante para a medição no espectrofotómetro. A cada medição foi reposta a quantidade retirada para análise, com PBS (pH 7,4). As leituras foram realizadas a 280 nm e o branco utilizado foi água miliQ. [42], [44] De notar que algumas amostras foram diluídas antes da medição no espectrofotómetro, de modo a estarem abrangidas pela gama de concentrações da curva de calibração. No final desta etapa é possível então obter o perfil de libertação da vancomicina (percentagem de fármaco libertado em função do tempo).

2.3.5. Testes de Compressão

A avaliação das propriedades mecânicas de hidrogéis é muitas vezes avaliada através de testes de compressão. [50] Estes testes permitem obter o módulo elástico/módulo de Young, que fornece informação à cerca das propriedades mecânicas do material. Os testes de compressão foram realizados no equipamento Hegewald & Peschke, Inspekt Mini Series (Figura 15), com uma célula de carga de 3 kN, até à rutura (completa destruição da amostra). Estes testes submeteram as amostras a uma força unidirecional (axial), provocada pela compressão da célula a uma taxa de 1mm/min e com uma força inicial de aproximadamente 2N. Todas as amostras possuem forma cilíndrica com um diâmetro médio de $14,22 \pm 0,32$ mm e uma espessura média de $2,25 \pm 0,22$ mm.

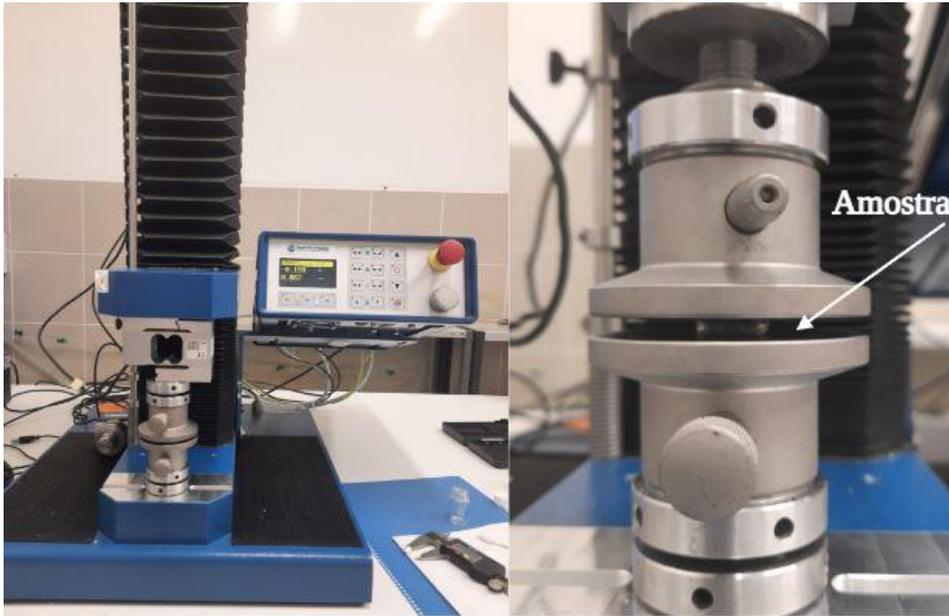


Figura 15 - Equipamento utilizado para os testes de compressão (Hegewald & Peschke, Inspekt Mini Series).

2.3.6. Testes de Biocompatibilidade

Todos os materiais/dispositivos médicos para poderem ser utilizados têm de passar pelos testes de biocompatibilidade. A viabilidade celular/ citotoxicidade do material produzido neste trabalho foi avaliada através do teste MTS (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium*) de acordo com a norma ISO 10993-5:2009 (Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Testes de citotoxicidade *in vitro*). Este modelo baseia-se na redução do MTS, na presença de PMS (metossulfato de fenazina), pela atividade metabólica das células que dá origem a um produto solúvel no meio de cultura, formazan, que é quantificado através da leitura da absorvância a 490 nm. [51]

As amostras das várias composições em estudo (n=5) foram colocadas em placas de 96 poços e seguidamente esterilizadas através de irradiação UV (254 nm, $\approx 7 \text{ mW/cm}^2$) durante 1 h. Uma vez que o material se destina a aplicações em tecido ósseo, as células utilizadas para o teste foram células normais de osteoblasto humano (hOB), numa densidade de 10×10^3 células/poço. Estas células foram semeadas nos poços contendo as amostras e incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 numa atmosfera humidificada, durante 1, 3 e 7 dias. Como controlo positivo (K+) foram utilizadas células incubadas com EtOH (70%), para o controlo negativo (K-) foram incubadas células apenas com o meio de cultura. A cada dia de incubação foi feita a reposição

do meio com uma mistura de 100 μL de meio de cultura fresco e de 20 μL de solução de reagente MTS/PMS. De seguida, a placa foi incubada por 4 h, a 37 °C, numa atmosfera a 5% de CO_2 novamente. Por último, a absorvância de cada amostra foi medida através de um leitor de microplacas de absorvância (Espectrofotómetro de microplacas *Biorad xMark*) a 490 nm.

3. Resultados e discussão

Os hidrogéis produzidos no presente trabalho têm como objetivo ser aplicados sob forma de injetáveis, de modo a que a gelificação ocorra *in situ*. Para este efeito é necessária uma seringa de dois tubos para que as soluções sejam misturadas aquando o momento da injeção e assim ocorrer a gelificação no local pretendido. A Figura 16 representa o esquema do funcionamento da seringa para injeção, em que a solução A representa o DexOx e as possíveis substâncias bioativas adicionadas e a solução B representa o reticulante. Na agulha da seringa está representada o conjunto dos componentes A e B, de modo a que haja uma mistura antes de o líquido deixar a seringa, proporcionando uma melhor homogeneidade no hidrogel. De notar que na agulha está representada a mistura dos componentes como se já tivesse ocorrido a gelificação completa, no entanto esta só ocorre *in situ*, o esquema apenas tem o intuito de simbolizar a mistura das duas soluções.

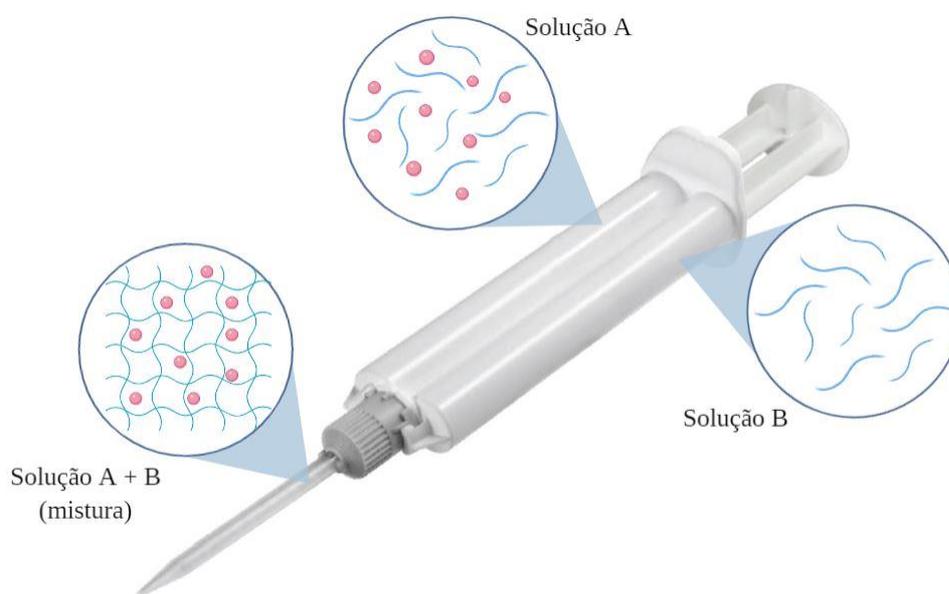


Figura 16 - Esquema do modo de aplicação dos hidrogéis através de uma seringa de dois tubos.

No processo laboratorial, não foi utilizado este tipo de seringas, apenas foram colocadas nas placas de poços as soluções A e B separadamente, recorrendo a micropipetas. Portanto, a

mistura que ocorre na agulha da seringa, neste caso só se consegue apenas com movimentos circulares com a ponta da micropipeta, o que não tem exatamente o mesmo efeito.

3.1. Síntese dos Hidrogéis

As amostras de DexOx/AAD gelificaram como pretendido. Os géis obtidos exibiram uma estrutura transparente, à exceção dos que contém inorgânicos que lhes conferem uma tonalidade branca, tal como se pode observar na Figura 17. O β -TCP apresenta um tom branco mais opaco do que a nHAp, o que pode estar relacionado com o tamanho das partículas.



Figura 17 - Hidrogéis DexOx/AAD, com as diferentes composições.

Os hidrogéis DexOx/MGel obtidos com o rácio 5/5 (m/m) não gelificaram e apresentaram uma tonalidade escura, supõe-se que devido a uma possível oxidação que possam ter sofrido. Na Figura 18 podem observar-se esses resultados.

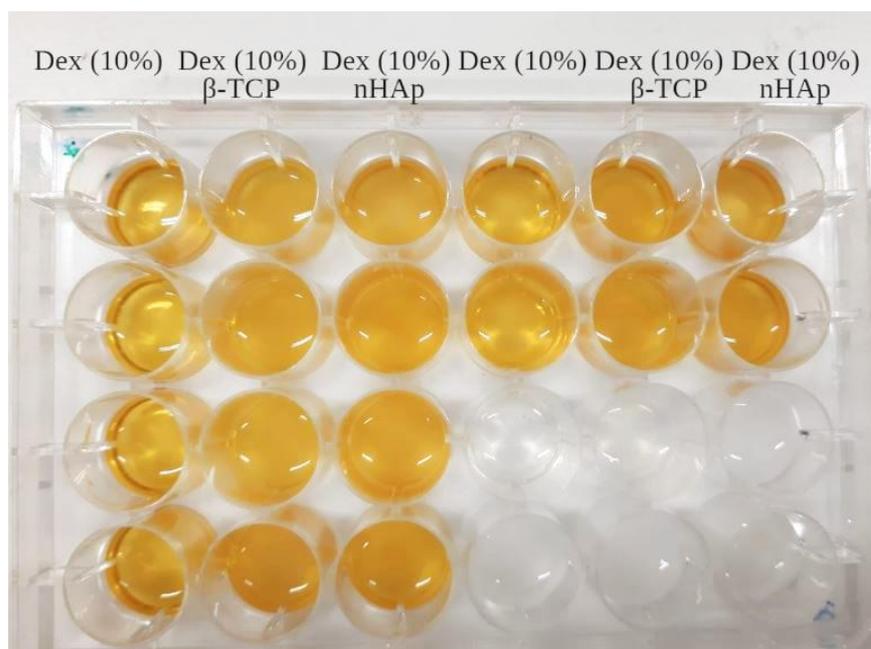


Figura 18 - Hidrogéis em proporções 5/5 (m/m) de DexOx/MGel.

Tendo em conta estes resultados, optou-se por testar outras proporções para verificar se o problema estava relacionado com a quantidade dos grupos funcionais disponíveis. Para o rácio de 6/4 (m/m) verificou-se o mesmo comportamento, as amostras apresentavam uma consistência viscosa, mas sem estrutura firme. Foram testadas ainda formulações com o rácio 7/3 (m/m), e verificou-se a mesma situação. O aumento na proporção de DexOx, faz com que existam mais grupos aldeído disponíveis para reagir com os grupos amina presentes na MGel, no entanto, apenas se verificou a formação de um líquido muito viscoso, novamente, o que descarta a hipótese de o problema residir na proporção dos constituintes. Assim, colocou-se a hipótese de a gelificação não ter ocorrido devido ao DO do DexOx ser menor do que o DO necessário, isto é, num DO de 25%, não há grupos funcionais suficientes para reticular e formar um gel estruturado. Deste modo, optou-se por fazer uma nova oxidação do Dex para um valor de DO de 50% de modo a aumentar o número de grupos aldeído presentes.

Contudo, depois de testar formulações de géis em proporções iguais de DexOx/MGel com o DexOx (DO=50%), os resultados obtidos demonstraram o mesmo comportamento que as formulações anteriores, o que levou a descartar a hipótese de que o DO do DexOx não teria pontos de reticulação suficientes.

Tendo em conta estes resultados, pressupõe-se que o problema não incida no DexOx mas sim na MGel, isto é, a modificação da Gel pode não ter ocorrido corretamente. Esta hipótese foi ainda sustentada pela análise dos resultados de FTIR-ATR (descritos na secção 3.2) em que se verificou a dificuldade na identificação do pico característico presente na MGel.

3.2. Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada - FTIR-ATR

Através da análise de FTIR-ATR foram obtidos os espectros dos hidrogéis e respetivos constituintes. Na Figura 19 encontram-se os espectros do AAD, do Dex, do DexOx e do hidrogel DexOx/AAD. A análise destes espectros permite não só caracterizá-los quimicamente através da identificação de ligações características, mas também verificar se o processo de oxidação e reticulação foram bem sucedidos.

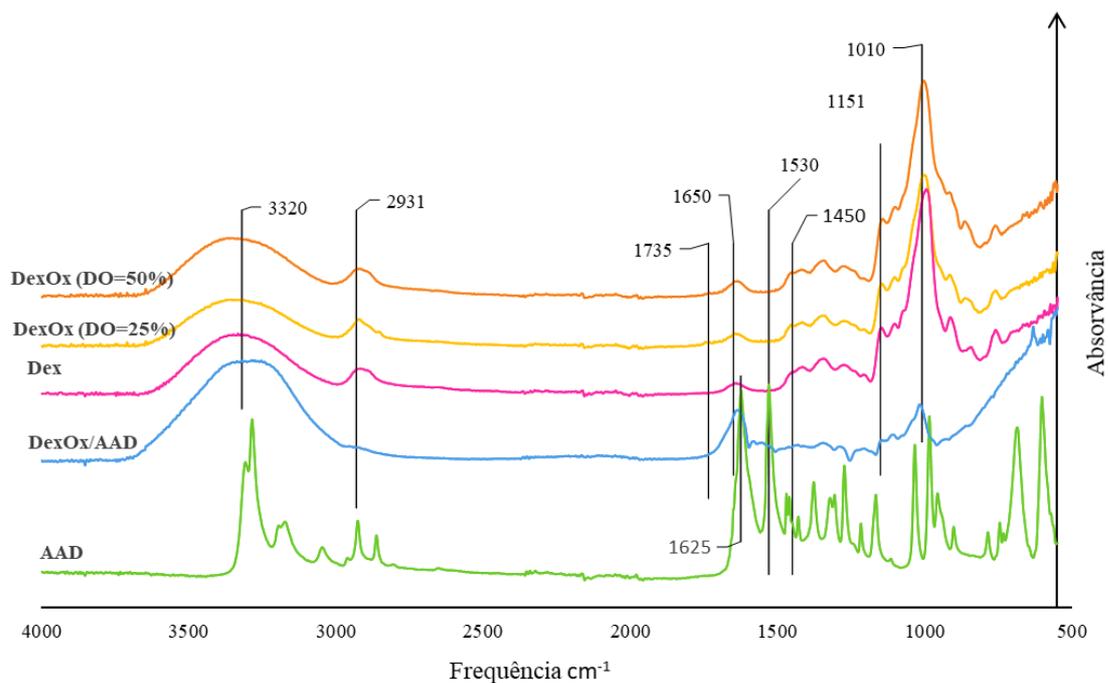


Figura 19 - Espectro obtido por FTIR-ATR do AAD, Dex, DexOx e do hidrogel DexOx/AAD.

Examinando o espectro do Dex e dos DexOx, é difícil identificar diferenças significativas correspondentes à introdução dos grupos aldeído. De acordo com a literatura, a banda correspondente ao alongamento da ligação C=O (carbonilo) dos grupos aldeído seria visível a

1735 cm^{-1} , no entanto este pico não é evidente nos espectros. Isto deve-se ao facto da baixa intensidade deste pico para valores de DO mais baixos, sendo que de acordo com a literatura, para um DO de 50% já seria possível observar esse pico mais pronunciado. [17] Apesar disso, no espectro obtido para o DexOx (DO=50%) não se observa o pico correspondente. Este facto pode estar relacionado com a formação de hemiacetais, entre os grupos aldeído e os grupos hidroxilo. [51] Analisando o espectro do DexOx/AAD verifica-se a existência de uma banda a 1650 cm^{-1} que diz respeito ao alongamento da ligação C=N das ligações hidrazona, o que comprova a existência da reticulação do DexOx com o AAD. [17] Uma vez não verificada a existência da ligação que caracteriza a oxidação do Dex, é possível concluir indiretamente que esta se realizou, uma vez que se verificou a reticulação com o AAD, que apenas é possível após a oxidação do Dex. Analisando o espectro do AAD em particular, verifica-se a existência de um pico a 1625 cm^{-1} que corresponde à deformação angular da ligação N-H pertencente ao grupo amina. Este pico após a reticulação não deveria estar presente no espectro do DexOx/AAD, no entanto não se consegue distinguir claramente, pois o pico a 1650 cm^{-1} referente à reticulação apresenta uma banda larga numa zona próxima. O mesmo acontece com o pico a 1530 cm^{-1} no espectro do AAD que também diz respeito à deformação angular da ligação N-H e que não aparece devido à reticulação. [17]

O pico de absorção a 1151 cm^{-1} está associado às vibrações da ligação C-O-C e às pontes glicosídicas no Dex, DexOx e no DexOx/AAD. No espectro do Dex e do DexOx é também possível observar os picos a 2931 cm^{-1} e a 1450 cm^{-1} que aparecem devido ao alongamento da ligação C-H, sendo este último menos pronunciado. O pico a 1010 cm^{-1} presente no Dex, nos DexOx e no DexOx/AAD, surge devido à grande flexibilidade presente nas ligações glicosídicas α -1,6. [57]

A 3320 cm^{-1} encontra-se a banda correspondente ao alongamento do grupo OH das frações do polissacarídeo, que se verifica no espectro do DexOx/AAD, do DexOx e do Dex. [58] No espectro do hidrogel DexOx/AAD esta banda aparece mais larga o que pode estar relacionado com o facto de o hidrogel Dex/AAD conter alguma água.

Na Figura 20 encontram-se os espectros correspondentes aos dois compostos inorgânicos e aos hidrogéis com e sem inorgânicos incorporados.

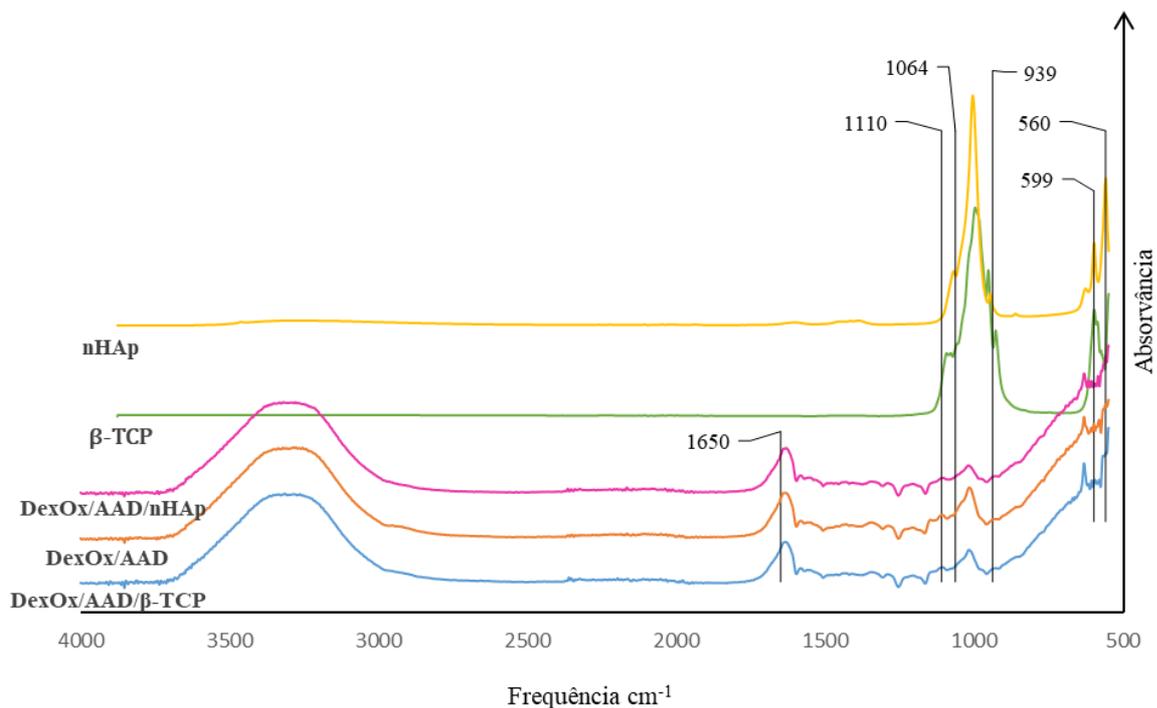


Figura 20 - Espectro obtido por FTIR-ATR do nHAp, do β -TCP e dos hidrogéis com nHAp e β -TCP.

Analisando a Figura 20, para avaliar a presença dos inorgânicos nos hidrogéis de DexOx e AAD, destacam-se algumas bandas características do β -TCP e da nHAp. A gama de bandas dos 939-1110 cm^{-1} dizem respeito às várias vibrações do ião PO_4^{3-} . Para além dessas, as bandas que se encontram a 560 cm^{-1} e a 599 cm^{-1} correspondem à deformação angular do ião PO_4^{3-} , que está presente nos dois espectros dos inorgânicos. O pico de absorção situado a 1064 cm^{-1} corresponde ao alongamento assimétrico da ligação P-O. [54] Comparando os espectros dos hidrogéis com e sem presença de inorgânicos não se detetam diferenças devido à baixa proporção de inorgânicos existente nos hidrogéis. O pico situado a 1650 cm^{-1} mais uma vez aparece nos espectros dos hidrogéis DexOx/AAD/ β -TCP, DexOx/AAD/nHAp e DexOx/AAD e representa o alongamento da ligação C=N, referente à reticulação.

Na Figura 21, estão representados os espectros obtidos da Gel e da MGel.

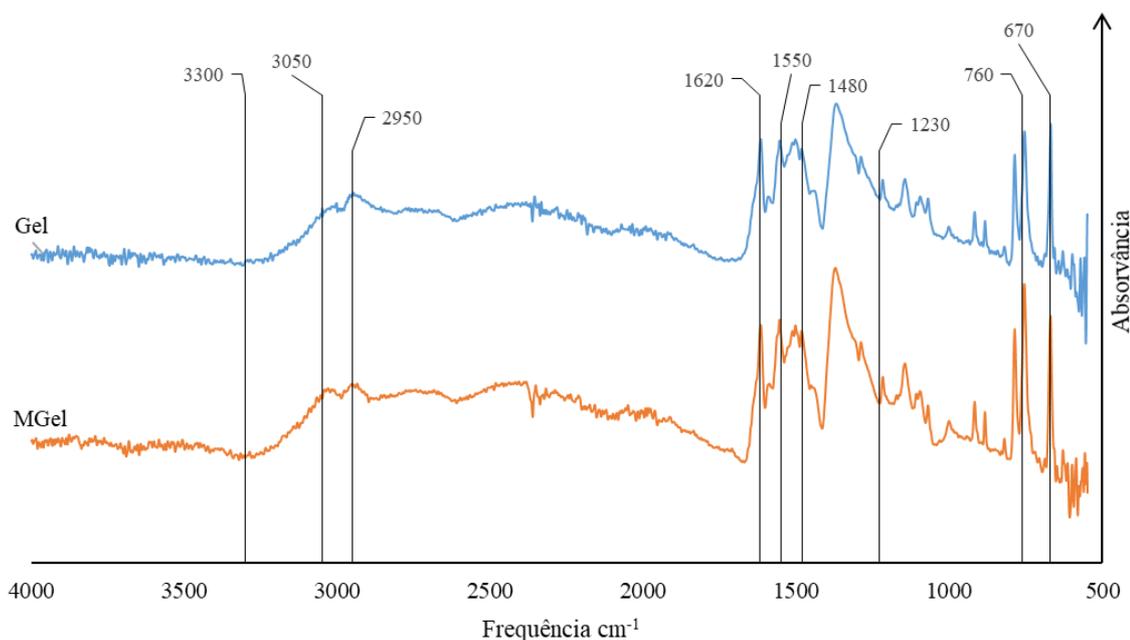


Figura 21 - Espectro obtido por FTIR-ATR da Gel e da MGel.

A gelatina é constituída por unidades de repetição unidas por ligações amida (características das proteínas) que apresentam algumas bandas de absorção características que se encontram sumariadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Bandas características da ligação amida num espectro de FTIR-ATR. [55]

Designação	Frequência aproximada (cm ⁻¹)	Tipo de ligação
Amida A	3300	NH alongamento
Amida B	3100	NH alongamento
Amida I	1600-1700	C=O alongamento
Amida II	1480-1575	CN alongamento, NH deformação angular
Amida III	1229-1301	CN alongamento, NH deformação angular
Amida IV	625-767	OCN estiramento

Nos espectros da Gel e da MGel as bandas 1620 cm⁻¹, 1550 cm⁻¹ e 1230 cm⁻¹, correspondem às amidas I, II e III respetivamente. A amida I está associada ao alongamento da

ligação C=O, a amida II representa a vibração da deformação angular dos grupos NH e a vibração de alongamento da ligação C-N, o mesmo acontece no caso da amida III. [56] De notar que o pico situado a 3300 cm^{-1} correspondente à amida A, deveria visualizar-se nos espetros [56], o facto de não se verificar, pode estar relacionado com problemas aquando da medição (colocação da amostra, falha do equipamento, problema na medição do *background*). Através do espetro obtido por FTIR não é possível confirmar a modificação da Gel, pois não se verificam alterações nos espetros. A ausência de diferenças pode sugerir que a modificação da Gel não ocorreu devidamente, ou apenas a análise de FTIR não é suficiente para detetar esta alteração. A primeira hipótese é mais plausível, uma vez que outro dos indicadores da modificação, é a não gelificação da solução de MGel à temperatura ambiente, o que não se verificou, pois esta acabou por gelificar após algum tempo.

3.3. Ressonância Magnética nuclear – RMN

A análise de RMN foi feita para avaliar a estrutura química e determinar o grau da primeira oxidação do Dex.

Analisando a Figura 22 (a) e (b), é possível observar os picos referentes aos hidrogénios dos carbonos que constituem o anel glicosídico (H_2 a H_6). O pico correspondente aos protões dos grupos aldeído do DexOx deveria localizar-se a 9,7 ppm, no entanto, este não é visível no espetro o que pode estar relacionado com dois fatores, a formação de hemiacetais e a temperatura a que a reação ocorreu. Para temperaturas mais elevadas, há formação de mais grupos aldeídos o que pode traduzir-se no aparecimento do pico. [57] Ainda na Figura 22 (a) e (b), na zona entre 4,2 ppm e 5,8 ppm os picos mais pequenos que se observam dizem respeito aos hemiacetais formados aquando da oxidação do Dex. Nesta gama é possível observar que no espetro do DexOx (DO=50%) os picos apresentam mais intensidade do que no espetro do DexOx (DO=25%), isto deve-se à existência de mais unidades oxidadas o que proporciona a formação de mais hemiacetais. Na Figura 22 (c) e (d) estes picos não se observam uma vez que após a adição do tBC os hemiacetais são parcialmente revertidos em aldeídos, permitindo assim a reação com o tBC. [17] O pico correspondente ao protão anomérico do C_1 encontra-se a 4,8ppm.

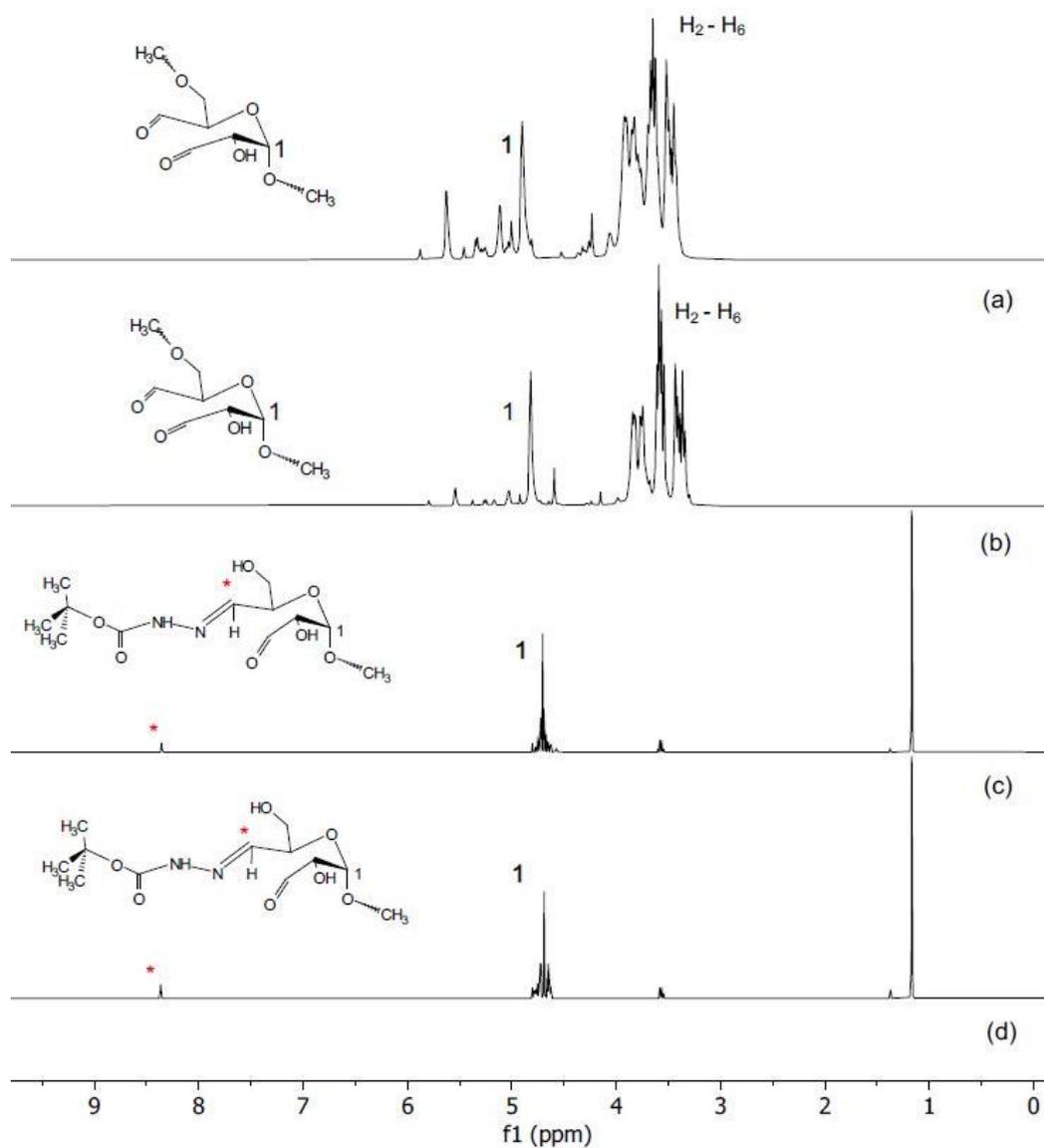


Figura 22 - Espectros de RMN, DexOx (DO=50%) (a), DexOx (DO=25%) (b) e DexOx (DO=50%) reagido com tBC (c), DexOx (DO=25%) reagido com tBC (d), com os picos a 8,3 ppm (*) e a 4,8 ppm (1) assinalados.

A determinação do DO é feita com base no rácio entre as áreas de dois picos, situados a 8,3 ppm e a 4,8 ppm, que estão representados e assinalados nos espectros da Figura 22 (c) e (d). Sendo que o pico situado a 8,3 ppm diz respeito ao próton da ligação formada entre o DexOx e o tBC, que está diretamente relacionado com o grau de oxidação do Dex. [17] Em alguns estudos da literatura este pico aparece mais deslocado à direita no espetro. Através de

alguns estudos é possível relacionar estes desvios com a conformação das moléculas, dependendo se estão na forma *cis* ou *trans*, o pico pode aparecer mais à direita ou mais à esquerda no espectro de RMN. [58] O pico a 4,8 ppm corresponde ao próton do C₁ do anel glicosídico do Dex comum em todas as unidades de glucose do Dex.

Através do *software MestReNova* calculou-se a área correspondente a estes dois picos, e através do rácio entre elas foi possível determinar o DO do DexOx (DO=25%) e do DexOx (DO=50%) (Anexo C), que resultou em 15,7% e 42,6% de oxidação, respetivamente.

3.4. Oxidação do Dextrano

Na Tabela 5 encontram-se os resultados obtidos experimentalmente para o valor de DO, relativamente à primeira (DO) e à segunda oxidação (*DO_{dupla}*) do Dex.

Tabela 5 - Grau de oxidação do Dex, dados teóricos e experimentais.

<i>DO</i> _{teórico} (%) ^a	<i>DO</i> _{experimental} (%) ^b	<i>DO</i> _{literatura} (%)	<i>DO</i> _{dupla,experimental} (%) ^c	<i>DO</i> _{dupla,literatura} (%)
25	15,7	14,3 [17]	7,6 ± 0,4	7,1 ± 0,1 [17]
50	42,6	43 [18]	13,2	–

a Calculado segundo o rácio molar de periodato de sódio por unidades iniciais de glucose.

b Calculado através da análise de RMN (Secção 3.3).

c Calculado através da titulação de ácido fórmico.

Para um DO teórico de 25 %, o valor de DO obtido experimentalmente para a primeira e segunda oxidações foi de 15,7 % e 7,6%, respetivamente e no caso de um DO teórico de 50%, o valor foi de 42,6 % e 13,2%, respetivamente. Estes valores, apesar de inferiores ao previsto apresentam coerência relativamente aos dados da literatura, como é possível observar na Tabela 5. Para o grau da segunda oxidação do DexOx (DO= 50%), pode apenas comparar-se com o valor do DexOx (DO= 25%) devido à ausência deste valor na literatura. Analisando os dois, verifica-se que o resultado obtido experimentalmente é coerente.

3.5. Capacidade de Inchaço

Os resultados obtidos para o rácio de capacidade de inchaço (*Swelling ratio* - S_r) estão representados na Figura 23, para que a sua compreensão seja facilitada, no entanto no Anexo D encontram-se todos os valores obtidos durante o ensaio.

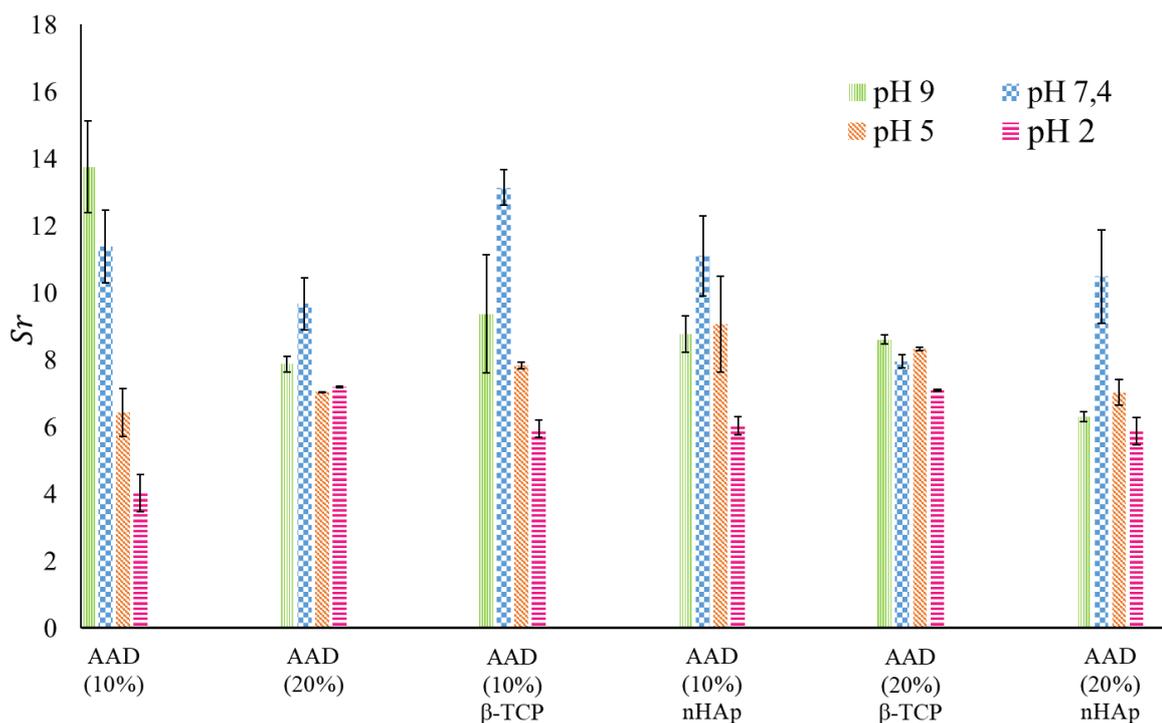


Figura 23 – Rácio de capacidade de inchaço a diferentes valores de pH e diferentes composições (n=2).

Através da Figura 23, é possível analisar que, de modo geral, a capacidade de inchaço é superior a pH 7,4, que corresponde ao valor do pH fisiológico. Isto era espectável uma vez que a pH neutro as amostras estariam mais estáveis, o que permite que as amostras se mantenham intumescidas algum tempo, sem sofrer uma degradação rápida que provoque a perda de água da sua matriz tridimensional. Do mesmo modo, é possível verificar que as amostras que apresentam menor S_r são as que foram expostas a pH 2. Estes resultados coincidem com o esperado, pois em meio ácido a degradação é favorecida, o que faz com que à medida que a amostra absorve água (devido ao carácter hidrofílico dos grupos hidroxilo) [59] algumas ligações vão sofrendo degradação, o que conduz a um S_r menor. De um modo geral a pH 5 e 9, verifica-se que estão os valores intermédios de S_r .

Passando a uma análise mais detalhada, primeiramente é possível verificar a influência da quantidade de reticulante (AAD) tem na capacidade de inchaço das amostras. Analisando os resultados obtidos verifica-se apenas em algumas amostras que com o aumento do reticulante capacidade de inchaço diminui. Tal era espectável, uma vez que, o aumento de reticulante proporciona uma estrutura mais fechada, com mais pontos de reticulação, o que dificulta mais a entrada de água na estrutura apesar do seu caráter hidrofílico. No entanto esta tendência não se verificou de uma forma constante. Esta variabilidade pode pôr em causa, de certo modo, a reprodutibilidade destes dados.

Analisando a influência da introdução dos inorgânicos na estrutura polimérica, é possível verificar que, não existe um comportamento consistente, em alguns casos as amostras com β -TCP apresentam um S_r maior, o que também acontece em algumas amostras com nHAp. Estes resultados levam a presumir que a presença dos inorgânicos não teve um efeito significativo na capacidade de inchaço dos hidrogéis.

3.6. Estudos de degradação

Antes de avaliar os resultados da degradação *in vitro*, é necessário compreender os mecanismos de degradação a que estes hidrogéis estão sujeitos. Os hidrogéis produzidos possuem ligações hidrazona nos pontos de reticulação e ligações glicosídicas na cadeia principal do DexOx.

As ligações glicosídicas são tipicamente degradadas por hidrólise (favorecida em meio ácido). [60] Para além da hidrólise, de acordo com a literatura, a cadeia principal de DexOx pode ser degradada pela reação de Maillard que é desencadeada pela formação da base Schiff. Estes dados da literatura foram suportados por análises de RMN, onde se verificou que, as estruturas de hemiacetais que se formam aquando a oxidação do Dex com o periodato, reagem com os grupos amina e sofrem um rearranjo de Amadori. Este rearranjo, por sua vez provoca a cisão do anel das unidades glicosídicas. [59], [61] No Anexo E estão esquematizados estes mecanismos. Existe a possibilidade de, no presente trabalho, as amostras terem sofrido este tipo de degradação, no entanto, não se detetou diferença na coloração dos géis, que pudesse indicar a sua ocorrência, nem foram aplicados métodos que pudessem comprová-la, caso tenha ocorrido.

Relativamente às ligações hidrazona, estas podem sofrer degradação também por hidrólise, que corresponde à reação inversa da formação destas ligações. Quando os hidrogéis estão na presença de água, o equilíbrio da reação da reticulação desloca-se no sentido inverso, provocando a quebra destas ligações que constituem os pontos de reticulação dos hidrogéis, conduzindo à sua degradação.

Os estudos de degradação, em termos de avaliação da variação da massa ao longo do tempo, foram realizados para as diferentes composições e para diferentes valores de pH. Na Figura 24 apresentam-se os gráficos correspondentes aos hidrogéis DexOx/AAD a pH 7,4, sendo estes o principal foco, uma vez que corresponde ao pH fisiológico em circunstâncias ditas normais.

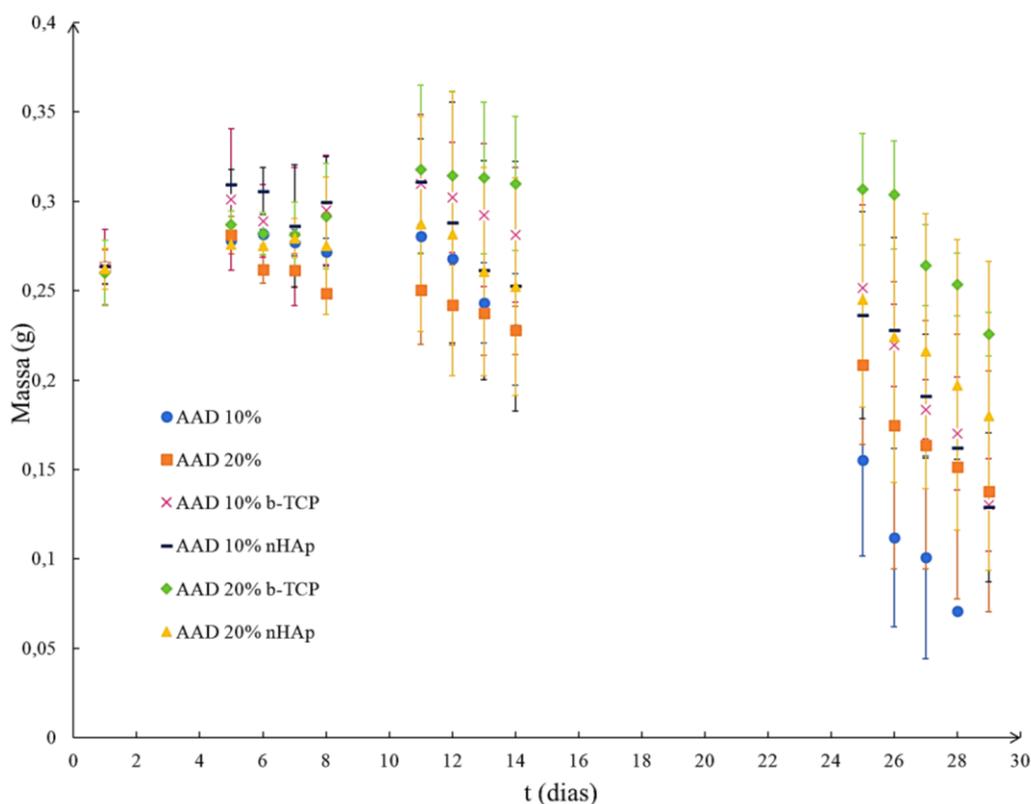


Figura 24 - Perfis de degradação (variação de massa em função do tempo) das diferentes amostras a pH 7,4 (n=2).

Analisando os perfis de degradação a pH 7,4 (Figura 24), é de destacar que as amostras com apenas 10% de reticulante apresentam uma maior taxa de degradação. A amostra apenas com DexOx e com 10% de AAD degradou ao fim de 28 dias. As restantes amostras com apenas 10% de AAD mantiveram-se durante 29 dias, no entanto é possível verificar que houve uma

perda de massa superior à das amostras com 20% de AAD. Estes resultados vão de acordo com o comportamento do S_r , isto é, as amostras com menor quantidade de reticulante originam estruturas com menor densidade de reticulação, o que proporciona um S_r maior. Sendo a presença de água um fator que desencadeia a degradação das ligações hidrazona, a menor densidade de reticulação facilita a entrada de água na matriz do material, o que conduz a uma degradação mais rápida. Ainda relativamente às amostras com 10% de AAD, existe um aumento de massa nos primeiros 4/5 dias, este aumento é resultado da degradação. Visto que, há medida que alguns pontos de reticulação são quebrados, a rede tridimensional fica mais aberta (com mais espaço livre) e isto permite que a estrutura absorva mais água provocando um aumento de massa.

Examinando os primeiros 4/5 dias, ao contrário das amostras com menos reticulante (10% AAD), as amostras com 20% AAD não apresentam um aumento de massa tão significativo, uma vez que possuem uma densidade de reticulação maior, mesmo que a estrutura comece a degradar com a presença de água no seu interior, esta ocorre mais lentamente devido à configuração mais fechada da rede. No entanto, é possível observar que em todas as amostras existe um aumento de massa nos primeiros 4/5 dias, seguido de um decréscimo, e entre os dias 8 e 11 volta a haver um aumento de massa. Estas oscilações levam a presumir que na primeira dezena de dias, vai ocorrendo degradação da estrutura por hidrólise e simultaneamente ainda ocorre absorção de água enquanto a estrutura ainda possui uma rede tridimensional relativamente densa. De notar que, para além da degradação das ligações hidrazona, também ocorre a degradação das ligações glicosídicas, quebrando assim as cadeias principais de DexOx. A quebra das ligações glicosídicas tem a particularidade de originar mais grupos hidroxilo (hidrofílicos), o que contribui para a absorção de mais água no período inicial da degradação. Após os 10/11 dias de degradação, verifica-se um decréscimo da massa, já sem oscilações, pois a estrutura do material já está comprometida.

Quanto à presença dos inorgânicos no material, analisando os perfis de degradação, não é possível encontrar um comportamento padrão nas amostras, o que não permite ter uma avaliação concreta da sua influência na degradação dos hidrogéis. Pode apenas referir-se que as amostras com a presença de inorgânicos apresentam uma degradação ligeiramente mais lenta, apresentando uma menor perda de massa no período de avaliação da degradação.

Generalizando, a pH 7,4, os hidrogéis possuem uma degradação lenta, de cerca de um mês, o que para a aplicação em vista é bastante promissor.

Na Figura 25, estão representados os perfis de degradação a pH 2 e como é possível observar são bastante distintos dos anteriores, visto que decorrem apenas em 8 dias.

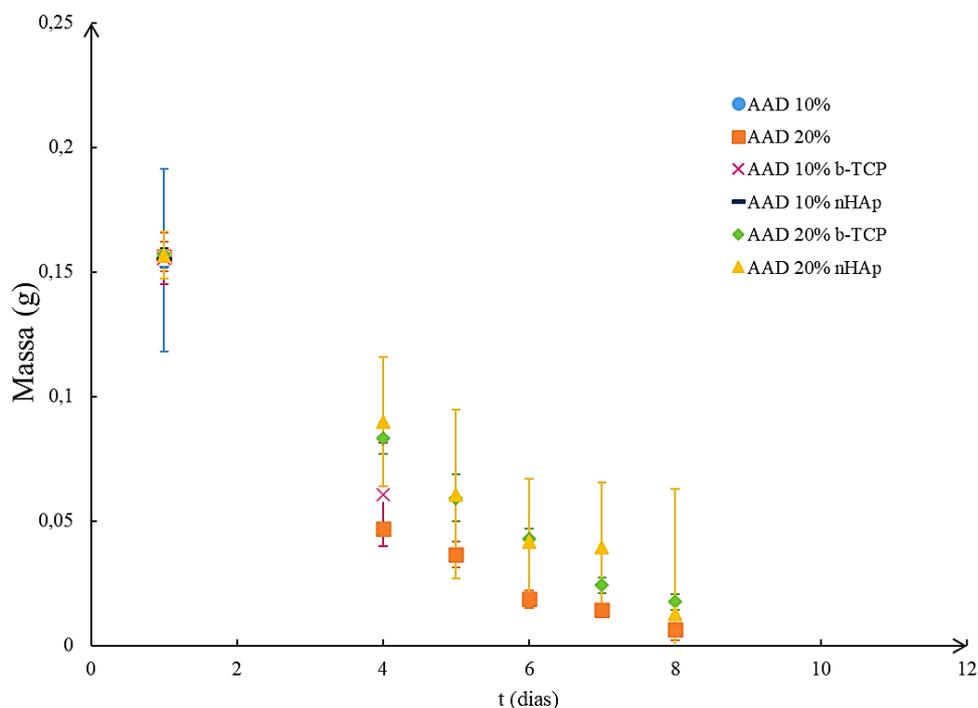


Figura 25 - Perfis de degradação (variação de massa em função do tempo) das diferentes amostras a pH 2 (n=2).

Este comportamento era esperado tendo em conta que as amostras estão sujeitas a um ambiente mais agressivo. A pH ácido existe uma maior quantidade de iões H_3O^+ o que faz com que a hidrólise das ligações hidrazona e das ligações glicosídicas seja favorecida, o que por sua vez, provoca uma degradação muito mais rápida. [17] As amostras com 10% de AAD, mais uma vez, degradaram em menos tempo que as restantes, devido às razões já referidas anteriormente, mas que, em ambiente ácido são muito mais notórias. Comparando o comportamento dos dois inorgânicos, mais uma vez não se verificam diferenças significativas entre eles.

A Figura 26 apresenta os perfis de degradação a pH 9, onde se pode notar que existe uma diferença significativa entre a duração das amostras com 10% e 20% de AAD.

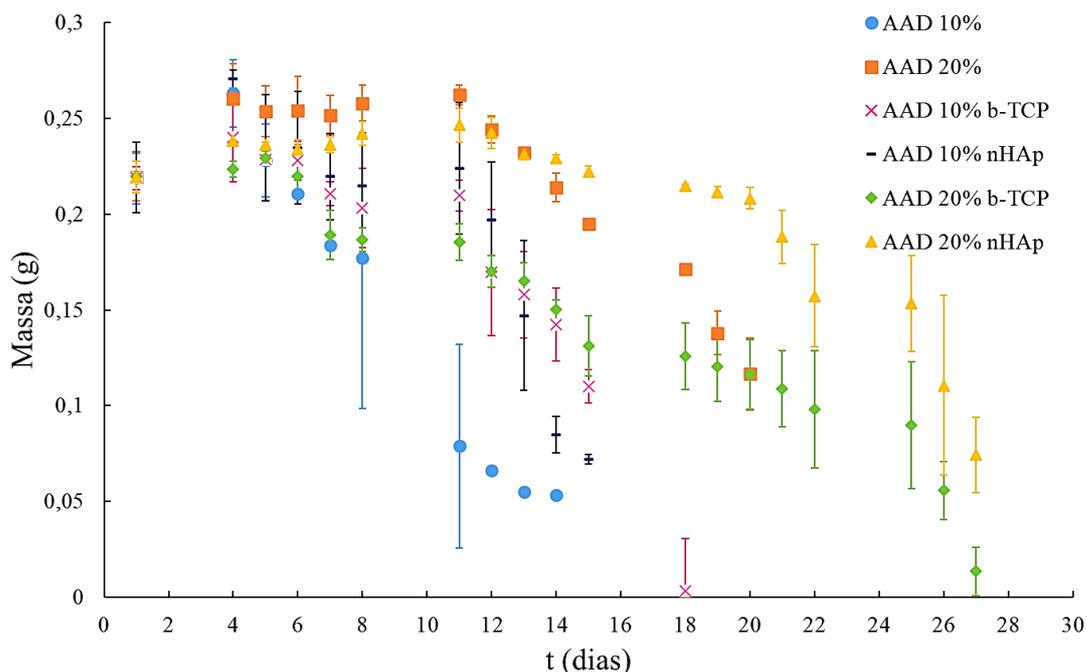


Figura 26 - Perfis de degradação (variação de massa em função do tempo) das diferentes amostras a pH 9 (n=2).

À semelhança dos casos anteriores, deve-se ao facto de quanto menor a quantidade de reticulante, menor o grau de reticulação, logo maior inchaço, o que por sua vez conduz a uma degradação mais rápida. Dentro das amostras com 10% de AAD, as amostras sem a presença de inorgânicos foram as primeiras a degradar, o que leva a presumir que a presença dos inorgânicos fortalece a estrutura, influenciando, de modo geral a degradação do hidrogel.

Por fim na Figura 27 encontram-se os perfis de degradação das amostras a pH 5.

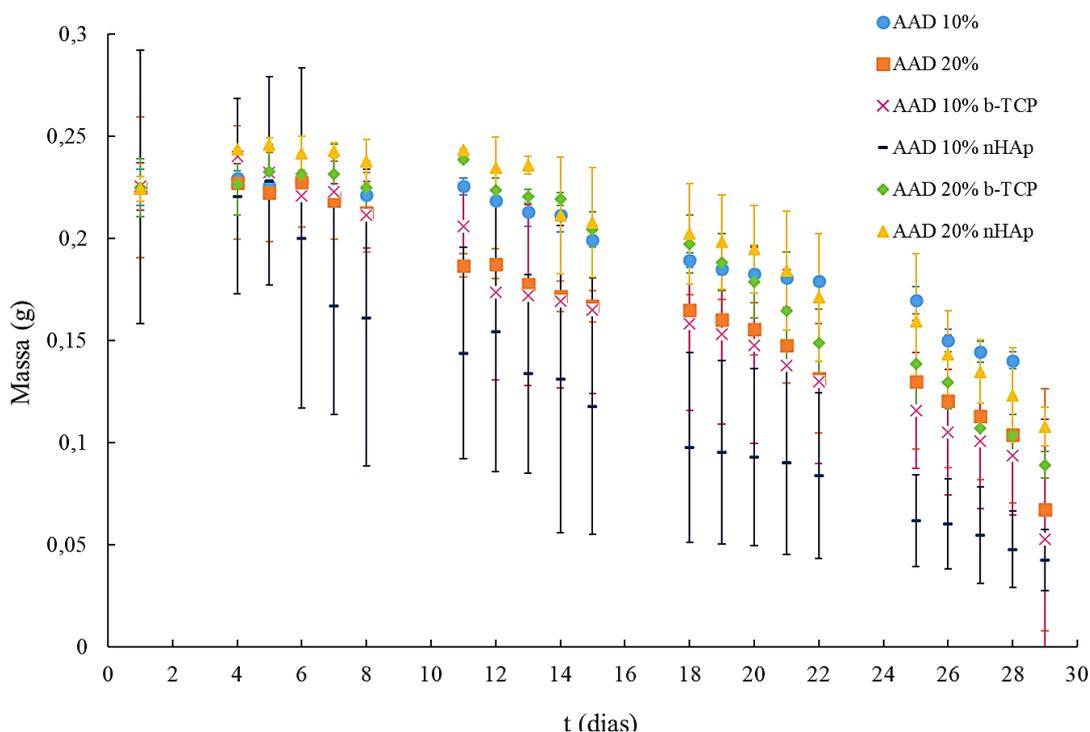


Figura 27 - Perfis de degradação (variação de massa em função do tempo) das diferentes amostras a pH 5 (n=2).

Analisando os perfis do comportamento dos hidrogéis em pH 5 verifica-se um comportamento semelhante ao obtido a pH 7,4, ou seja, os hidrogéis resistiram durante o período dos 29 dias. Relativamente à quantidade de reticulante, os hidrogéis apresentam mais uma vez o mesmo comportamento referido nos casos anteriores. Neste ensaio é importante salientar que os hidrogéis com 10% de AAD e nHAp apresentam valores elevados no desvio padrão comparativamente com as restantes amostras. Esta variabilidade está relacionada com a diferença de tamanho das réplicas, pois no processo de liofilização a amostra rachou e originou amostras com massas ligeiramente diferentes.

De modo geral, os perfis de degradação a pH 7,4 são o principal foco, visto que, em condições normais o material estará sujeito a pH fisiológico. Com a introdução do fármaco no material (descrita mais adiante), pode ocorrer uma variação de pH na zona circundante ao material, visto que a solução do fármaco possui um pH mais ácido (2,5 – 4,5). [67] Para além disso, caso surja algum tipo de infeção no local, é provável que o pH diminua. Assim, interessa também canalizar as atenções para os perfis a pH 5. De acordo com os resultados da degradação a pH 5, o material apresenta uma durabilidade, até degradar, de cerca de um mês, tal como a

pH 7,4. Estes resultados são vantajosos na medida em que nem a introdução do fármaco, nem uma possível infecção, não irão comprometer de uma forma significativa a durabilidade do material, mesmo com o decréscimo do pH provocado por estas situações.

A Figura 28 mostra os perfis de degradação obtidos a pH 7,4 e 5 em paralelo com o cronograma do processo de cicatrização/regeneração óssea. As amostras escolhidas para esta análise foram as amostras com 20% AAD e com a presença de inorgânicos visto que são as que apresentam melhores resultados.

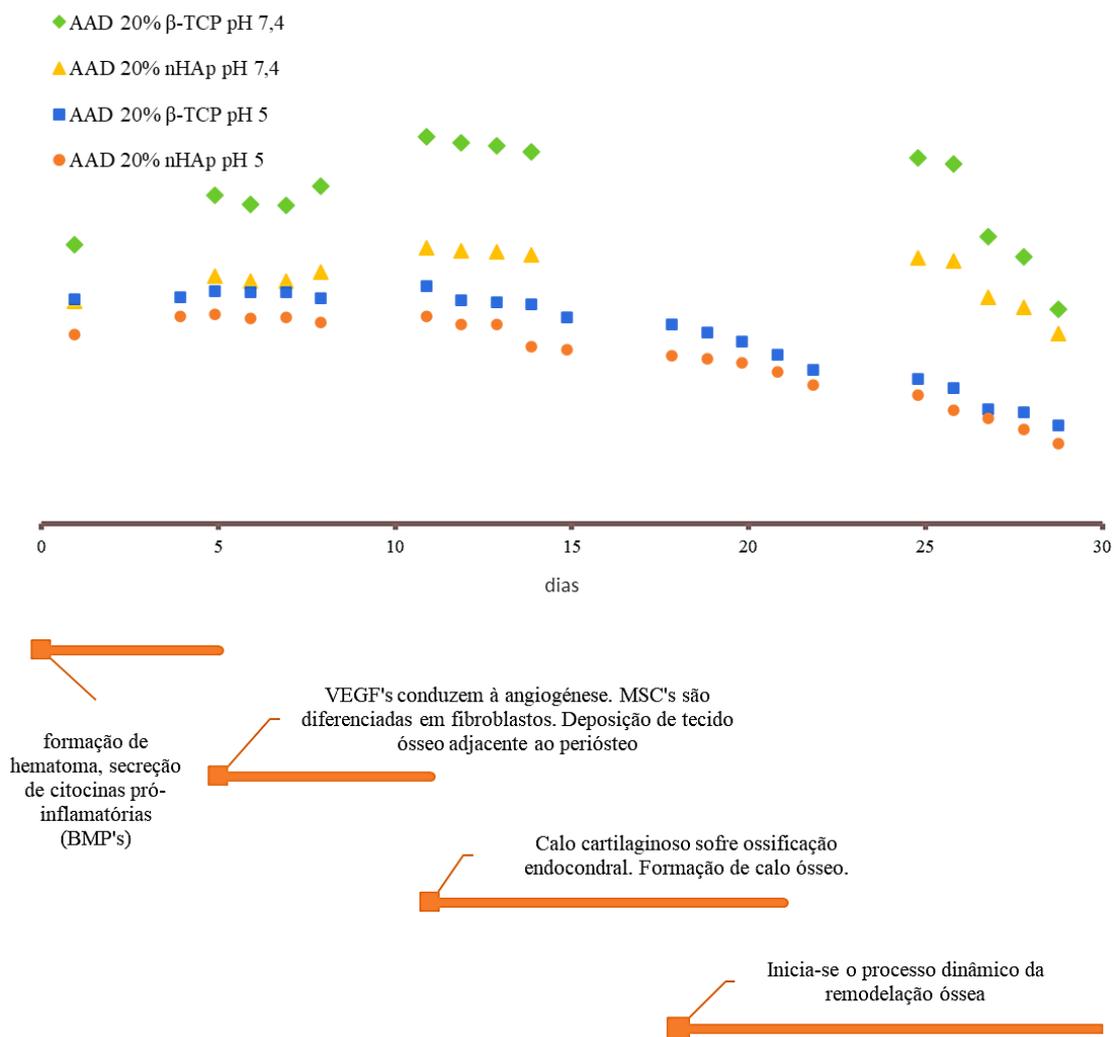


Figura 28 - Cronograma do processo de cicatrização/regeneração óssea.

Na Figura 28 é possível verificar que nos primeiros 5 dias, quando ocorre a formação de hematoma e a libertação de BMP's, e ao mesmo tempo vai ocorrer o inchaço do material, o que significa que o material contém uma quantidade elevada de fluidos no seu interior. Este inchaço é favorável nesta fase, pois facilita a mobilidade dos fluidos que conduzem as BMP's para o local, assim como células e nutrientes. O mesmo acontece na segunda fase, 5°-10° dia, em que os VEGF's e as MSC's migram para o local para iniciar a angiogénese e a diferenciação em fibroblastos. Até ao 12° dia, aproximadamente, o material absorve uma quantidade significativa de fluidos à medida que vai degradando. Este inchaço é mais notório nos perfis a pH 7,4, que serão as condições ideais. A pH 5 o inchaço não é tão significativo o que poderá traduzir-se numa ligeira dificuldade na mobilidade dos fluídos e substâncias bioativas envolvidas. Analisando agora a terceira e quarta fases, onde se inicia a ossificação endocondral do calo cartilaginoso e formação de calo ósseo, o perfil de degradação apresenta um decréscimo até ao final dos 30 dias. Este comportamento sugere que à medida que ocorre deposição óssea, o material vai sofrendo degradação, permitindo a formação do novo tecido.

De notar que estes resultados são benéficos e vão ao encontro do objetivo pretendido, no entanto, o processo de cicatrização/regeneração óssea em indivíduos com idades mais avançadas, ocorre mais lentamente. Assim, seria vantajoso que a degradação do material fosse mais prolongada para garantir que acompanha o processo de regeneração até ao final.

3.7. Testes de Compressão

Através dos testes de compressão realizados foi possível determinar o Módulo de Young para todas as composições testadas ao longo do trabalho. Na Tabela 6, encontram-se esses mesmos valores, assim como os valores da tensão compressiva máxima.

Tabela 6 - Módulo de Young para as várias composições das amostras (n=3).

Composição das Amostras		Módulo de Young (kPa)	Tensão compressiva máxima ^a
DexOx (20 % (m/m))	AAD (10%)	206 ± 33	121 ± 24
	AAD (20%)	250 ± 39	73 ± 2
	AAD (10%)	240 ± 24	120 ± 28
	β-TCP (1% (m/v))		
	AAD (10%)	243 ± 18	57 ± 4
	nHAp (1% (m/v))		
	AAD (20%)	283 ± 77	73 ± 2
	β-TCP (1% (m/v))		
	AAD (20%)	277 ± 40	61 ± 12
nHAp (1% (m/v))			

^aTensão compressiva máxima atingida antes da rutura.

Como é possível observar na Tabela 6, as amostras apresentam valores de módulo de Young entre 200 e 300 kPa. Analisando as diferenças entre as várias composições, é possível verificar que com o aumento da percentagem de reticulante as amostras tornam-se mais resistentes, o que se traduz num módulo mais elevado. A introdução dos inorgânicos na matriz teve como objetivo principal o reforço em termos de propriedades mecânicas. Tal verificou-se, na medida em que nas amostras com 10% AAD, a introdução dos inorgânicos conduziu a um módulo de Young mais elevado, verificando-se o mesmo para hidrogéis com 20% AAD.

Comparando os valores obtidos para os dois compostos inorgânicos, não é possível observar diferenças significativas, o que leva a concluir que a utilização dos dois inorgânicos favorece as propriedades mecânicas da matriz de suporte, mas não existe preferência entre eles no que diz respeito ao reforço do material.

Na literatura encontram-se valores numa vasta gama para o módulo de Young neste tipo de *matrizes tridimensionais de suportes*. Hidrogéis à base de Dex e Gel (semelhantes aos do presente trabalho) apresentam valores de aproximadamente 140 ± 29 kPa, [18], ligeiramente inferiores aos obtidos nos hidrogéis desenvolvidos. Outro estudo, de hidrogéis de PEGDM (poli(etilenoglicol) dimetacrilato) reforçados com NFC (nano fibras de celulose, obteve valores para o módulo de Young de 150-300 kPa de acordo com a quantidade de celulose incorporada. [63] Esta gama já apresenta valores mais próximos dos obtidos neste trabalho. Outro estudo que desenvolveu criogéis à base de Dex e Gel, obteve valores mais baixos para o módulo de Young, $2,78 \pm 0,08$ kPa. [64] Por último, um estudo de hidrogéis à base de colagénio, PCLC (poli(lactida-co- ϵ -caprolactona) e hidroxiapatite, apresentaram um módulo de Young de 5 kPa. [4] Em suma, os valores obtidos para o módulo de Young são bastante favoráveis tendo em conta o panorama dos valores encontrados na literatura para materiais semelhantes.

Observando agora a tensão máxima suportada pelo material antes da rutura, verifica-se uma grande variabilidade nos dados e também nos respetivos valores de desvio padrão. O que impossibilita uma análise conclusiva destes dados, pois não existe uma relação coerente entre os valores obtidos e as diferentes composições dos hidrogéis. Estes resultados não conclusivos podem estar relacionados com o tamanho das amostras, isto é, devido ao molde onde foram feitos os hidrogéis (placa de poços), a superfície dos mesmos fica inevitavelmente com uma forma côncava na superfície. Esta forma, aleada à pequena espessura das amostras, dificulta o ensaio de compressão. Deste modo, para melhorar estes resultados, as amostras deveriam apresentar uma espessura maior para o equipamento conseguir percorrer uma maior distância até à destruição da amostra e serem produzidas em moldes de Teflon de modo a tentar evitar a concavidade na superfície da amostra e facilitar a sua remoção.

3.8. Libertação de Vancomicina

O estudo da libertação controlada de vancomicina foi realizado para as diferentes composições dos hidrogéis em análise. Os perfis cumulativos de libertação obtidos encontram-se representados na Figura 29.

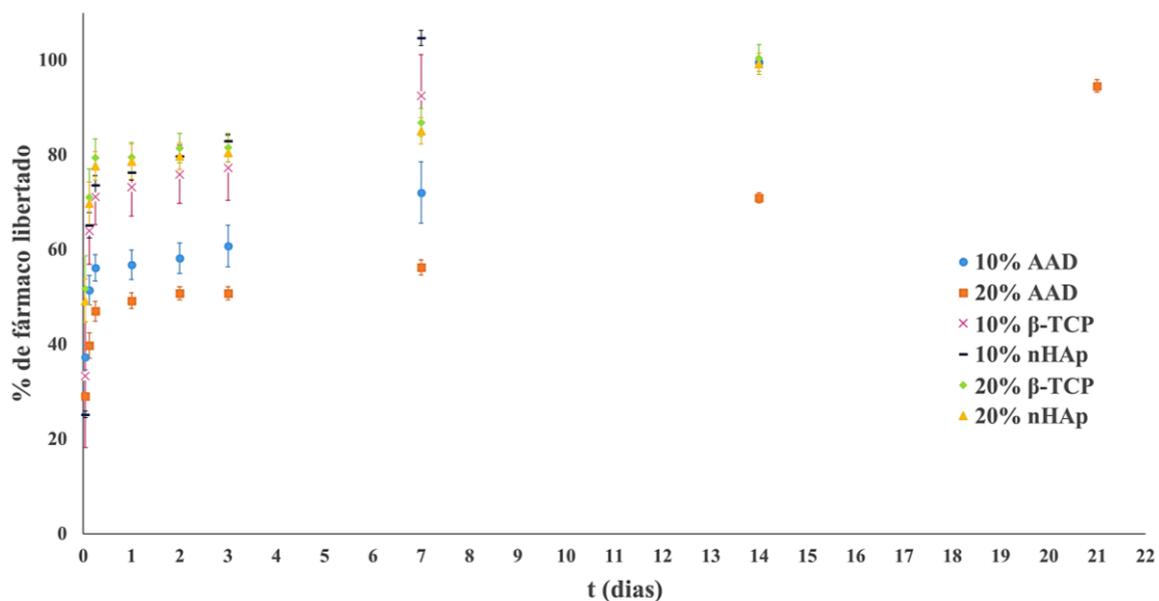


Figura 29 - Perfis cumulativos de liberação controlada de Vancomicina para as diversas composições de hidrogéis, (n=3).

Analisando as várias curvas cumulativas é possível verificar que existe um *burst* inicial durante as primeiras horas, atingindo mais de 50% de liberação do fármaco, seguido de uma fase bastante mais lenta. Este comportamento inicial é vantajoso para a aplicação em defeitos ósseos e fraturas, dado que a liberação rápida no estágio inicial irá prevenir eventuais infeções e provocar a morte de microrganismos indesejáveis presentes no local do implante, impedindo a formação de biofilmes. A fase seguinte de liberação mais lenta, vem prevenir infeções no local do implante durante o processo de cura e regeneração de novo tecido. [65] O *burst* inicial está associado a uma liberação das moléculas de fármaco situadas na superfície da matriz de suporte, enquanto que a segunda fase está relacionada com a liberação das moléculas de fármaco aprisionadas no interior da matriz, que é afetada pela taxa de degradação do material, proporcionando uma liberação mais lenta. [65]

A maioria dos perfis demonstram que é possível manter uma liberação durante cerca de 14 dias, o que é bastante favorável tendo em conta que, em circunstâncias normais, ao 5º dia do processo de cicatrização/regeneração óssea inicia-se a deposição de tecido ósseo, ou seja, a fase de maior probabilidade de ocorrer infeção seria acompanhada pela presença de fármaco. De notar que, apenas as amostras com 20% AAD sem a presença de inorgânicos, apresentam uma liberação até 21 dias, ao contrário das restantes. Estes resultados advêm de uma maior

reticulação, que por sua vez provoca uma degradação mais lenta, o que conduz a uma taxa de libertação menor.

Salientando a influência dos inorgânicos nos perfis de libertação, é notório que as amostras com a presença dos mesmos, apresentam uma libertação mais rápida. No caso das amostras com inorgânicos e 10% AAD, a libertação ocorreu apenas por 7 dias, e com um *burst* inicial a atingir cerca de 70% a 80% de fármaco. Por outro lado, as amostras com inorgânicos e 20% AAD, apresentam o mesmo comportamento no *burst* inicial, mas com uma libertação durante os 14 dias. Estes resultados indicam que a taxa de libertação do fármaco é influenciada tanto pelo grau de reticulação da amostra, como pela presença dos compostos inorgânicos na matriz. Quanto maior grau de reticulação, mais lenta é a libertação do fármaco, tal como esperado. Relativamente à presença de inorgânicos é possível notar que esta conduz a uma libertação mais rápida, o que pode estar associado ao aumento da porosidade provocada pela adição destes compostos, inorgânico e fármaco, à matriz do material. A presença destes compostos vai criar mais poros na matriz, que por sua vez permite a entrada e circulação de fluidos, o que provoca um aumento da difusão do fármaco para fora do material.

A quantidade de fármaco presente em cada amostra é ligeiramente baixa, pois a solução inicial de vancomicina para injeção, foi diluída de acordo com o indicado pelo fabricante, originando uma solução de baixa concentração (5% (m/v)). No entanto, é importante verificar as doses recomendadas para o uso deste fármaco. Na Tabela 7 estão sumarizadas as doses recomendadas para um tratamento com vancomicina por via intravenosa. [66]

Tabela 7 - Doses recomendadas.

	Dose terapêutica recomendada	Dose máxima
≥ 12 anos	15 a 20 <i>mg/kg</i> peso corporal ^a cada 8 a 12h	Não exceder 2g
Lactentes e crianças com idades entre 1 mês e 12 anos	10 a 15 <i>mg/kg</i> peso corporal ^a cada 6h	–

No presente trabalho, a ação do fármaco irá ser localizada, ou seja, será colocado exatamente no local alvo, portanto, a quantidade de fármaco necessária para prevenir infeções, será menor do que as doses recomendadas para administração intravenosa para tratar uma infeção já existente (Tabela 7).

A título de exemplo, considerando as amostras com 20% AAD e com inorgânico incorporado, estas proporcionaram uma libertação de cerca de 80% durante as primeiras 6h, o que se traduz em 10 mg em 6h. A partir dos valores da Tabela 7 apenas é possível ter uma ideia de que não é necessário as amostras conterem quantidades tão elevadas de fármaco, pois o objetivo é prevenir infeções atuando diretamente no local e não por via sistémica. No entanto, tendo em conta os valores obtidos neste ensaio, a quantidade a incorporar nas amostras deveria ser maior, para proporcionar um efeito mais eficaz. De notar que, como os perfis de libertação demonstram uma libertação muito rápida no início, com as composições testadas, não poderá manter-se um tratamento prolongado através do fármaco presente no material. Deste modo o fármaco no material tem como principal função prevenir que eventuais infeções se desenvolvam. No caso de se desenvolver uma infeção grave, deverá recorrer-se a um tratamento auxiliar, como por exemplo por administração intravenosa.

3.9. Testes de Biocompatibilidade

O teste MTS permitiu obter imagens das células em contacto com o material e também a percentagem de viabilidade das mesmas no dia 1, 3 e 7. Na Figura 30 encontram-se os resultados da viabilidade celular. No Anexo F encontram-se os registos de imagem recolhidos ao longo do ensaio.

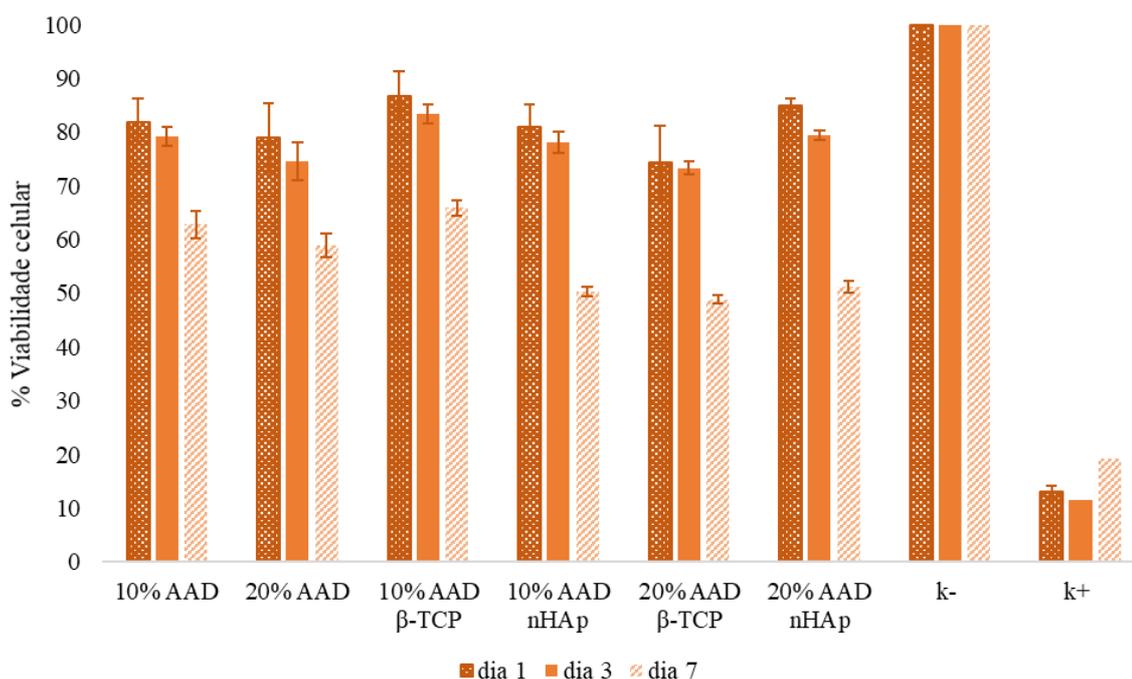


Figura 30 - Resultados da viabilidade celular dos osteoblastos após 1, 3 e 7 dias de contacto com os hidrogéis (n=5).

Analisando a Figura 30, verifica-se que no primeiro dia a viabilidade celular apresenta valores entre os 70 e 80%, o que significa que a grande maioria das células em contacto com o material permaneceu viável e metabolicamente capacitada. No terceiro dia, os valores mantêm-se semelhantes, apenas apresentam um ligeiro decréscimo. Os resultados correspondentes ao sétimo dia já apresentam viabilidade entre os 50 e 60%, sendo esta um pouco insatisfatória, pois no período de 7 dias de incubação a % de viabilidade decresce significativamente em comparação com o controlo negativo (K^-).

Tendo em conta as diferentes composições, é de notar que, as amostras com mais reticulante apresentam valores de viabilidade mais baixa. Sendo que o Dex é um material com boa biocompatibilidade, estes resultados podem estar relacionados com a presença do AAD, uma vez que este composto é um ácido pode apresentar alguma toxicidade e afetar negativamente a viabilidade e a capacidade metabólica das células. Analisando os resultados tendo em conta os diferentes compostos inorgânicos, verifica-se que as amostras com 10% de AAD e com β -TCP apresentam maior viabilidade do que as amostras com 10% de AAD e com nHAp, deste modo o β -TCP seria melhor a nível de viabilidade celular do que o nHAp. No entanto nas amostras com 20% de AAD, não se verifica essa diferença. Esta inconsistência nos

dados relativamente aos dois inorgânicos, não permite fazer uma análise conclusiva de qual proporciona melhor viabilidade celular. Apenas se pode afirmar que tanto a quantidade de reticulante como o tipo de inorgânico têm influência na biocompatibilidade do material.

Na generalidade, os resultados são satisfatórios para os primeiros dias. Contudo, o decréscimo atingido ao 7º dia é significativo. Assim, o material apresenta alguma citotoxicidade, o que sugere que a quantidade de AAD, ou a sua substituição devem ser repensadas e reavaliadas.

4. Conclusões e trabalhos futuros

4.1. Conclusões

O principal objetivo deste trabalho, consistiu em desenvolver hidrogéis com diferentes composições e escolher qual delas a melhor tendo em conta os requisitos para a aplicação em vista. O desenvolvimento dos hidrogéis DexOx/AAD foi atingido, mas a síntese dos hidrogéis DexOx/MGel não. Tendo sido sintetizadas apenas as amostras de DexOx/AAD, serão discutidos os resultados da sua caracterização, escolhendo quais as melhores das seis composições testadas.

O processo de síntese dos hidrogéis, envolveu uma etapa prévia de modificação do Dex. Através da análise de FTIR e de RMN esta modificação foi comprovada com sucesso e a determinação do DO coincidiu com o esperado, obtendo-se um DexOx com um DO de 14,8% para a primeira oxidação e de 7,6% para a segunda. Após a síntese dos hidrogéis e a caracterização química dos mesmos, foram avaliados vários parâmetros, como degradação, libertação de vancomicina, testes de compressão e testes de biocompatibilidade.

Relativamente à degradação dos hidrogéis, que foi testada a quatro valores de pH diferentes, em geral, os resultados obtidos foram bastante positivos. As amostras a pH 2 e 9 apresentaram uma durabilidade mais curta, tal como era espectável. As amostras submetidas a pH 7,4 e 5, que serão os valores mais prováveis do ambiente a que estas amostras estarão expostas na sua aplicação, apresentaram uma durabilidade de cerca de um mês até se degradarem, o que coincide com o tempo de regeneração do tecido ósseo em circunstâncias normais. De um modo geral, o material apresenta uma taxa de degradação adequada, que acompanhará a taxa de regeneração óssea. De todas as composições testadas, as amostras com maior quantidade de reticulante e com a presença de inorgânicos (DexOx/AAD (20%)/inorgânico) apresentaram melhores resultados, pois possuem uma densidade de reticulação maior que se traduz numa degradação mais lenta.

Os resultados dos testes de compressão foram relativamente consistentes com dados encontrados na literatura para este tipo de materiais. O módulo de Young das amostras apresenta valores entre os 200-300 kPa. As amostras com o módulo mais elevado, ou seja, mais resistentes, foram as amostras com mais reticulante e com presença de inorgânicos

(DexOx/AAD(20%)/inorgânico), o que era espectável. Apesar destes resultados até coincidirem com valores da literatura e com o esperado, apresentam valores de desvio padrão um pouco elevados, o que coloca dúvidas na reprodutibilidade destes dados devido à geometria da amostra usada nos testes.

Relativamente à libertação controlada, o fármaco utilizado, vancomicina, foi incorporado no material, com sucesso. A sua libertação durou em média 14 dias, no entanto verificou-se que a maioria do fármaco, cerca de 70%, é libertado durante as primeiras 24h. Este *burst* inicial é vantajoso para prevenir que ocorra uma infeção no local da lesão, no entanto, nos dias seguintes a quantidade libertada decresce bastante, impossibilitando um tratamento prolongado. Dentro das composições testadas, as amostras com mais reticulante e sem inorgânicos incorporados (DexOx/AAD (20%)) foram as que apresentaram uma libertação durante 21 dias, ou seja, libertam fármaco durante um período que acompanha grande parte do período de regeneração do tecido ósseo.

Os testes de biocompatibilidade permitiram avaliar a viabilidade e a capacidade de atividade metabólica das células em contacto com o material. Os resultados mostraram que até ao 3º dia as células apresentam viabilidade de cerca de 70 a 80%. Ao 7º dia os resultados obtidos apresentaram um decréscimo mais significativo, rondando os 50 a 60 % de viabilidade celular. Este decréscimo é possível que esteja relacionado com a presença do AAD, que pelo seu carácter ácido poderá apresentar alguma toxicidade para as células.

De modo a poder escolher a melhor composição, é necessário avaliar todos os testes realizados de uma perspetiva geral, para que se possa perceber qual das composições apresenta mais vantagens para a aplicação pretendida. Assim, na Tabela 8 estão sumarizados os testes realizados e assinaladas quais as composições com melhores resultados para cada um deles.

Tabela 8 - Avaliação de todas as composições em estudo para cada teste realizado ao longo do trabalho.

Composição das Amostras	DexOx (20 % (m/m))					
	AAD (10%)	AAD (20%)	AAD (10%) β -TCP (1% (m/v))	AAD (10%) nHAp (1% (m/v))	AAD (20%) β -TCP (1% (m/v))	AAD (20%) nHAp (1% (m/v))
	A	B	C	D	E	F
Degradação					x	x
Libertação De Fármaco		x				
Testes de compressão					x	x
Biocompatibilidade	x		x			

Através da Tabela 8, é possível observar que as composições E e F apresentam melhores resultados para um maior número de requisitos. Tendo em conta a aplicação como matrizes tridimensionais de suporte para regeneração óssea, o tempo de degradação é um fator bastante importante, e, portanto, estas composições (E e F) cumprem este requisito de uma forma bastante positiva. Visto que o osso é um material bastante rígido, que exerce uma função de suporte e que está exposto a diversas tensões, os testes de compressão são também um dos mais importantes, para os quais as composições E e F obtiveram os melhores resultados. A presença de fármaco no material e a sua libertação é um aspeto importante para prevenir eventuais infeções, no entanto as composições E e F apresentam os piores resultados para este teste, na medida em que libertam cerca de 80% do fármaco nas primeiras 24h, e entre o dia 1 e 14 libertam quantidades muito pequenas que podem não ser suficientes para combater uma infeção caso esta permaneça após o primeiro dia. Apesar das composições E e F apresentarem à partida os piores resultados neste teste, são resultados positivos numa perspetiva preventiva. Na eventual possibilidade de ocorrer uma infeção mais grave e a quantidade libertada nas primeiras 24h não ser suficiente para a travar, poderá recorrer-se ao auxílio de um tratamento externo à matriz tridimensional de suporte, como por exemplo a administração de vancomicina por via intravenosa. O mesmo acontece com os testes de biocompatibilidade, apesar das composições E e F não apresentarem os melhores resultados, o balanço entre os restantes requisitos levam a que estas sejam as composições mais promissoras.

4.2. Trabalhos futuros

Tendo em conta os resultados obtidos para os vários requisitos avaliados, é essencial retificar alguns aspetos e considerar possíveis alterações.

Em primeiro lugar, seria vantajoso rever e reproduzir novamente o processo de modificação da Gel, tendo particular atenção à etapa do ajuste do pH antes da adição do EDC. Depois, fazer os hidrogéis DexOx/MGel como previsto e realizar todos os estudos de caracterização feitos para os hidrogéis de DexOx/AAD, para poder comparar resultados.

Relativamente aos hidrogéis DexOx/AAD, e tendo em conta os resultados obtidos no presente trabalho, seria essencial rever as condições dos testes de compressão, para obter melhores resultados e com mais reprodutibilidade. Para isso seria necessário realizá-los com amostras com uma maior espessura e produzi-los em moldes de Teflon para evitar a concavidade na superfície do material e facilitar a sua remoção.

Quanto ao ensaio de libertação controlada, seria proveitoso repetir o ensaio com uma maior quantidade de fármaco por amostra, perceber se o comportamento se mantinha semelhante e cruzar essa informação com as doses recomendadas de vancomicina para tratamento de infeções. Para possibilitar um tratamento prolongado deveria estudar-se uma composição do material com maior grau de reticulação, aumentando o DO do DexOx ou a quantidade de reticulante, ou ainda a possibilidade de ligar covalentemente o fármaco ao material. Estas alterações poderão proporcionar uma libertação mais lenta, e provavelmente uma degradação também mais lenta.

Devido aos resultados pouco apelativos dos testes de biocompatibilidade, seria necessário rever e reavaliar a quantidade de reticulante a utilizar ou mesmo substituí-lo, como é caso dos hidrogéis DexOx/MGel, que à partida deverão apresentar uma melhor biocompatibilidade, devido às propriedades e às semelhanças da MGel com o colagénio presente no organismo humano.

Um aspeto extremamente importante neste tipo de materiais é a análise da microestrutura, nomeadamente da porosidade, determinando o tamanho médio dos poros do material e a existência ou não de interconetividade entre eles. Na presente dissertação não se avaliou esta característica, portanto seria um aspeto a avaliar futuramente, de modo a poder concluir se o material apresenta um tamanho médio dos poros adequado à proliferação celular

e ao transporte de nutrientes. Algumas das técnicas que poderiam ser utilizadas para o efeito seriam MIP (Porosimetria de intrusão de mercúrio) e SEM (Microscopia eletrónica de varrimento). Para além de fazer a caracterização das amostras “acabadas” de produzir, seria interessante avaliar a evolução do tamanho médio dos poros ao longo do período de degradação.

Outro aspeto a avaliar seria a viscosidade das duas frações que perfazem o material, de modo a perceber se existe semelhanças entre elas, para que, aquando a injeção através seringa de dois tubos, o tempo de escoamento fosse semelhante proporcionando uma mistura eficiente.

5. Referências bibliográficas

- [1] – Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P.V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*. **9**: 66-76.
- [2] – Howard, D.; Buttery, L.D.; Shakesheff, K.M.; Roberts, S. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*, **213(1)**: 66-72.
- [3] – Khademhosseini, A.; Langer, R. (2016). A decade of progress in tissue engineering. *Nature Protocols*, **11(10)**: 1775-1781.
- [4] – Polo-Corrales, L.; Latorre-Esteves, M.; Ramirez-Vick, J. (2014). Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. **14(1)**: 15-56.
- [5] – Chang, B.; Ahuja, N.; Ma, C.; Liu X. (2017) Injectable scaffolds: preparation and application in dental and craniofacial regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. **111**: 1-26.
- [6] – Wang, W.; Yeung, K.W.K. (2017) Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review. *Bioactive Materials*. **2**: 224-247.
- [7] – Moreno, M.; Amaral, M.H.; Lobo, J.M.S.; Silva, A.C. (2016). Scaffolds for Bone Regeneration: state of the art. *Current Pharmaceutical Design*. **22(18)**: 2726-2736
- [8] – Stratton, S.; Shelke, N.B.; Hoshino, K.; Rudraiah, S.; Kumbar, S.G. (2016) Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*. **1**: 93-108.
- [9] – Bai, X.; Gao, M.; Syed, S.; Zhuang, J.; Xu, X.; Zhang, X.Q. (2018). Bioactive hydrogels for bone regeneration. *Bioactive Materials*. **3(4)**: 401-417.
- [10] – Saekhor, K.; Udomsinprasert, W.; Honsawek, S.; Tachaboonyakiat, W. (2019). Preparation of an injectable modified chitosan-based hydrogel approaching for bone tissue engineering. *Biological Macromolecules*. **123**: 167-173.
- [11] – Păunica-Panea, G.; Ficai, A.; Marin, M.M.; Marin, S.; Albu, M.G.; Constantin, V.D.; Dinu-Pîrvu, C.; Vuluga, Z.; Corobea, M.C.; Ghica, M.V. (2016). New collagen-dextran-zinc oxide composites for wound dressing. *Journal of Nanomaterials*. **2016**: 7.

- [12] – Inci, I.; Kirsebom, H.; Galaev, I.Y.; Mattiasson, B.; Piskin, E. (2013). Gelatin cryogels crosslinked with oxidized dextran and containing freshly formed hydroxyapatite as potential bone tissue-engineering scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. **7(7)**: 584-588.
- [13] – Du, Z.; Li, N.; Hua, Y.; Shi, Y.; Bao, C.; Zhang, H.; Yang, Y.; Lin, Q.; Zhu, L. (2017). Physiological pH-dependent gelation for 3D printing based on the phase separation of gelatin and oxidized dextran. *Chemical Communications*. **53(97)**: 13023-13026.
- [14] – Zhang, Y.; Zhang, X.; Xu, L.; Wei, S.; Zhai, M. (2015). Radiation cross-linked collagen/dextran dermal scaffolds: effects of dextran on cross-linking and degradation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **26(3)**: 162-180.
- [15] – Zhao, X.; Li, P.; Guo, B.; Ma, P.X. (2015). Antibacterial and conductive injectable hydrogels based on quaternized chitosan-graft-polyaniline/oxidized dextran for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. **26**: 236-248.
- [16] – Zhang, X.; Yang, Y.; Yao, J.; Shao, Z.; Chen, X. (2014). Strong collagen hydrogels by oxidized dextran modification. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. **2(5)**: 1318-1324.
- [17] – Maia, J.; Ferreira, L.; Carvalho, R.; Ramos, M.A.; Gil, M.H. (2005). Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. *Polymer*. **46(23)**: 9604-9614.
- [18] – Pan, J.F.; Yuan, L.; Guo, C.A.; Geng, X.H.; Fei, T.; Fan, W.S.; Li, S.; Yuan, H.F.; Yan, Z.Q.; Mo, X.M. (2014) Fabrication of modified dextran–gelatin in situ forming hydrogel and application in cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*. **2(47)**: 8346-8360.
- [19] – Charoenlarp, P.; Rajendran, A.K.; Iseki, S. (2017). Role of fibroblast growth factors in bone regeneration. *Inflammation and Regeneration*. **37**: 10.
- [20] – Hu, K.; Olsen, B.R. (2016) The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. **91**: 30-38
- [21] – Dubruel, P.; Vlierberghe, S.V. (2014). *Biomaterials for bone Regeneration, Novel techniques and applications*. 1st ed. Elsevier. United Kingdom.

- [22] – Hollinger, J.O.; Einhorn, T.A.; Doll, B.A.; Sfeir, C. (2004). Bone tissue engineering. 1st ed. CRC Press. United States of America.
- [23] – Jayakumar, P.; Silvio, L.D. (2010). Osteoblasts in bone tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. **224(12)**: 1415-1440.
- [24] – SEER Training Modules, Structure of Bone Tissue. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Acedido a: junho, 2020, em:
<https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>
- [25] – Holland, T.A.; Mikos, A.G. (2006) Review: biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue engineering through controlled drug delivery. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. **102**: 161-185.
- [26] – Silva, R.F.; Sasso, G.R.S.; Cerri, E.S.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. (2015). Review article: biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*. **2015**: article ID: 421746, 17 pp.
- [27] – Dimitriou, R.; Tsiridis, E.; Giannoudis, P.V. (2005). Review: current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury, International Journal of the Care of the Injured*. **36(12)**: 1392-1404.
- [28] – Sheen, J.R.; Garla, V.V. (2020). Fracture Healing Overview. In: StatPearls. Acedido a: julho 2020, em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551678/>
- [29] - O'Brien, F. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. **14(3)**: 88-95.
- [30] – Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science*. **2011**: article ID: 290602, 19 pp.
- [31] – Albrektsson, T.; Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*. **10(2)**: S96-101.

- [32] – Naessens, M.; Cerdobbel, A.; Soetaert, W.; Vandamme, E. (2005). Leuconostoc dextranucrase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **80(8)**: 845 - 860.
- [33] – Phillips, G.O.; Williams, P.A. (2011). Handbook of food proteins. 1st ed., Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, UK. pp: 92-113.
- [34] – Lopez-Cebral, R.; Martín-Pastor, M.; Parraga, J.E.; Zorzi, G.K.; Seijo, B.; Sanchez, A. (2011). Chemically modified gelatin as biomaterial in the design of new nanomedicines. *Medicinal Chemistry*. **7(3)**:145-154.
- [35] – Hayrapetyan, A.; Bongio, M.; Leeuwenburgh, S.C.G.; Jansen, J.A.; van den Beucken, J.J.P. (2016). Effect of nano-HA/collagen composite hydrogels on osteogenic behaviour of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. **12(3)**: 352-364.
- [36] – Jeong, J.; Kim, J.H.; Shim, J. H.; Hwang, N. S.; Heo, C.Y. (2019). Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials Research*. **23**: 4.
- [37] – Wei, G.; Ma, P.X. (2004). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. **25(19)**: 4749-4759.
- [38] – Bagher, z.; Rajaei, F.; Shokrgozar, M. (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.
- [39] – Calori, I.R.; Braga, G.; Jesus, P.C.C.; Bi, H.; Tedesco, A. C. (2020). Polymer scaffolds as drug delivery systems. *European Polymer Journal*. **129**: 109621, 66 pp
- [40] – Coimbra, P.M.A. (2010). *Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural*. Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química, 242 pp. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10316/14502>
- [41] – National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 14969, Vancomycin. Acedido a: novembro 2020, em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vancomycin>.

- [42] – Avani, F.; Damoogh, S.; Mottaghitalab, F.; Karkhaneh, A.; Farokhi, M. (2019). Vancomycin loaded halloysite nanotubes embedded in silk fibroin hydrogel applicable for bone tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. **69(1)**: 32-43.
- [43] – Jiang, J.L.; Li, Y.L.; Fang, T.L.; Zhou, J.; Li, X.L.; Wang, Y.C.; Dong, J. (2012). Vancomycin-loaded nano-hydroxyapatite pellets to treat MRSA-induced chronic osteomyelitis with bone defect in rabbits. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*. **61(3)**: 207-215.
- [44] – Cheng, T.; Qu, H.; Zhang, G.; Zhang, X. (2018). Osteogenic and antibacterial properties of vancomycin-laden mesoporous bioglass/PLGA composite scaffolds for bone regeneration in infected bone defects. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. **46(8)**: 1935-1947.
- [45] – Cabral, J.D.; Roxburgh, M.; Shi, Z.; Liu, L.; McConnell, M.; Williams, G.; Evans, N.; Hanton, L-R.; Simpson, J.; Moratti, S.C.; Robinson, B.H.; Wormald, P.J.; Robinson S. (2014). Synthesis, physiochemical characterization, and biocompatibility of a chitosan/dextran-based hydrogel for postsurgical adhesion prevention. *Journal of materials science. Materials in medicine*. **25(12)**: 2743-2756.
- [46] – Lisman, A.; Butruk, B.; Wasiak, I.; Ciach, T. (2014). Dextran/albumin hydrogel sealant for Dacron® vascular prosthesis. *Journal of Biomaterials Applications*. **28(9)**: 1386-96.
- [47] – Bruker. Home, Produtos, Ressonância Magnética, RMN. Acedido a: novembro 2020, em: <https://www.bruker.com/pt/products/mr/nmr.html>
- [48] – Jeol. TOP, Products, Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR), NMR basic knowledge. Acedido a: novembro 2020, em: <https://www.jeol.co.jp/en/products/nmr/basics.html>
- [49] – Hilal, N.; Ismail, A.F.; Matsuura, T.; Oatley-Radcliffe, D. (2017). Membrane characterization. 1st ed., Elsevier. Amsterdam, Netherlands. pp: 4-11.

- [50] – Xiao, Y.; Friis, E.A.; Gehrke, S.H.; Detamore, M.S. (2013). Mechanical testing of hydrogels in cartilage tissue engineering: beyond the compressive modulus. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. **9(5)**: 403-412.
- [51] – Kuete, V. (2017). Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases. 1st ed., Academic Press-Elsevier. Cambridge, Massachusetts. pp. 272-274
- [52] – Yang, Y.; Peng, Q.; Guo Y.; Han, Y.; Xiao, H.; Zhou, Z. (2015). Isolation and characterization of dextran produced by leuconostoc citreum NM105 from manchurian sauerkraut. *Carbohydrate Polymers*. **133**: 365-72.
- [53] – Xu, R.B.; Yang, X.; Wang, J.; Zhao, H.T.; Lu, W.H.; Cui, J.; Cheng, C.L.; Zou, P.; Huang, W.W.; Wang, P.; Li, W.J.; Hu, X.L. (2012). Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pine cones. *International Journal of Molecular Sciences*. **13(11)**: 14262-14277.
- [54] – Liao, J.; Li, Y.; Li, H.; Liu, J.; Xie, Y.; Wang, J.; Zhang, Y. (2018). Preparation, bioactivity and mechanism of nano-hydroxyapatite/sodium alginate/chitosan bone repair material. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. **16(1)**: 28-35.
- [55] – Kong, J.; Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*. **39(8)**: 549-559.
- [56] – Merina, P.D.; Suguna, P.R.; Karpuram, P.; Vijaylakshmi J.V.; Renuka, M. (2017). Extraction and characterization of gelatin: a functional biopolymer. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*. **9(9)**: 975-1491.
- [57] – Oliver, S.; Thomas, D.S.; Kavallaris, M.; Vittorio, O.; Boyer, C. (2016). Efficient functionalisation of dextran-aldehyde with catechin: potential applications in the treatment of cancer. *Polymer Chemistry*. **7**: 2542-2552.
- [58] – Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of Alkenes. (2020). *Chemistry – LibreTexts*. Acedido a: julho 2021, em: <https://chem.libretexts.org/@go/page/873>

- [59] –Nonsuwan, P.; Matsugami, A.; Hayashi, F.; Hyon, S.H.; Matsumura, K. (2019). Controlling the degradation of an oxidized dextran-based hydrogel independent of the mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*. **204**: 131-141.
- [60] –Kristiansen, K.A.; Potthast, A.; Christensen, B.E. (2010). Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research*. **345**: 1264-1271.
- [61] –Chimpibul, W.; Nagashima, T.; Hayashi, F.; Nakajima, N.; Hyon, S. H.; Matsumura, K. (2016). Dextran oxidized by a malaprade reaction shows main chain scission through a maillard reaction triggered by schiff base formation between aldehydes and amines. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. **54(14)**: 2254-2260.
- [62] – Access data FDA. VIALS VANCOCIN® HCl Vancomycin Hydrochloride for Injection USP For Intravenous Use. Acedido em janeiro 2021, em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/060180s047lbl.pdf
- [63] – Khoushabi, A.; Schmocker, A.; Pioletti, D.P.; Moser, C.; Schizas, C.; Månson, J.A.; Bourban, P.E. (2015). Photo-polymerization, swelling and mechanical properties of cellulose fibre reinforced poly(ethylene glycol) hydrogels. *Composites Science and Technology*. **119**: 93-99.
- [64] – Chippada, U., Yurke, B.; Langrana, N.A. (2010) Simultaneous determination of Young's modulus, shear modulus, and Poisson's ratio of soft hydrogels. *Journal of Materials Research*. **25**: 545–555. (2010).
- [65] – Aviv, M.; Berdicevsky, I.; Zilberman, M. (2007). Gentamicin-loaded bioresorbable films for prevention of bacterial infections associated with orthopedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **83(1)**: 10-19.
- [66] –Infarmed, documentos, Vancomicina. (Última atualização 2017). Vancomicina- artigo 31-1440 – Infarmed. Anexo 1 – Lista de medicamentos autorizados nacionalmente. Acedido a: março 2021, em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2323424/Vancomicina+-+anexo.pdf>

Anexo A – Solução de PBS

A solução de PBS foi preparada misturando 4g de cloreto de sódio (NaCl), 100 mg de cloreto de potássio (KCl), 720 mg de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e 123 mg de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em 500 mL de água destilada. O pH da solução obtida é aproximadamente de 7,4 (semelhante ao do organismo). Os sais KCl e NaCl mimetizam a força iónica que existe nos fluidos corporais. Para as soluções de PBS com diferentes valores de pH, este foi ajustado com a adição de HCl e/ou NaOH, ambos em soluções de 0,1M para atingir um carácter mais ácido e/ou mais básico, respetivamente.

Anexo B – Curva de Calibração de Vancomicina

A curva de calibração da vancomicina foi realizada através da preparação de soluções padrão de vancomicina (0,5 mg/mL – 0,015 mg/mL) e posterior medição da absorvância a 280nm no espectrofotómetro. Através de uma regressão linear podemos obter uma relação entre estes dois parâmetros, de modo a ter uma equação que permita calcular a concentração do fármaco no ensaio de libertação controlada. A curva de calibração obtida (absorvância em função da concentração de vancomicina) está representada na Figura B.1.

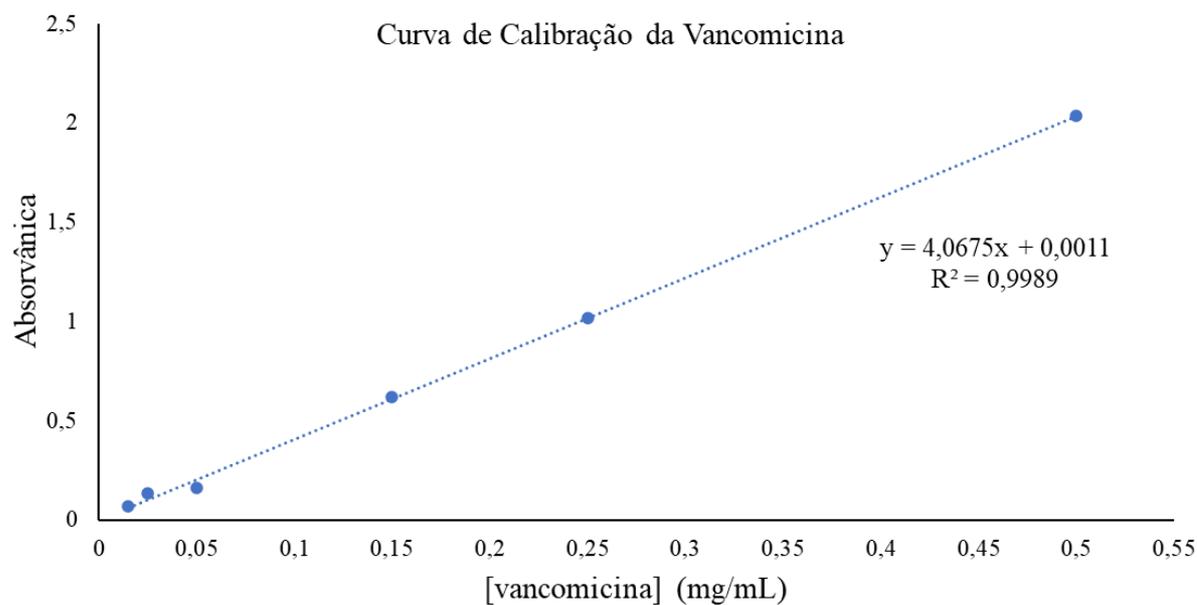


Figura B.1 - Curva de calibração da Vancomicina.

Anexo C – Cálculo do grau de oxidação do DexOx

Através do ensaio RMN foi possível obter o espectro do DexOx reagido com tBC. Através do *software* MestReNova foi possível determinar as áreas referentes aos picos 8,3 ppm e 4,8 ppm. A equação C.1. e C.2. representam o rácio entre as áreas destes picos que permitem obter o valor do grau de oxidação para o DexOx (DO=25%) e DexOx (DO=50%), respetivamente.

$$\frac{\text{Área}_{8,3 \text{ ppm}}}{\text{Área}_{4,8 \text{ ppm}}} = \frac{780,58}{4987,33} \times 100 = 15,7 \% \quad (\text{C.1.})$$

$$\frac{\text{Área}_{8,3 \text{ ppm}}}{\text{Área}_{4,8 \text{ ppm}}} = \frac{957,06}{2247,56} \times 100 = 42,6 \% \quad (\text{C.2.})$$

Anexo D – Dados obtidos na determinação da capacidade de inchaço

Na tabela D.1 estão registados os valores obtidos para a determinação da capacidade de inchaço.

Tabela D.1 - Dados obtidos para a determinação da capacidade de inchaço dos hidrogéis produzidos.

pH	Composição dos hidrogéis ^a	m_i (g)	m_f (g)	S_r (%)	S_r médio (%)	
9	AAD (10%)	0,0147	0,2025	12,78	13,95 ± 1,17	
		0,0146	0,2354	15,12		
	AAD (20%)	0,0250	0,2278	8,11	7,87 ± 0,24	
		0,0235	0,2028	7,63		
	DexOx (20% (m/m)) +	AAD (10%)	0,0275	0,2368	7,61	9,37 ± 1,76
		β -TCP (1%(m/v))	0,0205	0,2487	11,13	
	AAD (10%)	0,0245	0,2526	9,31	8,77 ± 0,54	
		nHAp (1%(m/v))	0,0234	0,2158		8,22
	AAD (20%)	0,0295	0,2872	8,74	8,61 ± 0,13	
		β -TCP (1%(m/v))	0,0302	0,2864		8,48
	AAD (20%)	0,0318	0,2277	6,16	6,31 ± 0,15	
		nHAp (1% (m/v))	0,0283	0,2109		6,45
7	AAD (10%)	0,0393	0,5291	12,46	11,89 ± 1,09	
		0,0466	0,5261	10,29		
	AAD (20%)	0,0553	0,5468	8,89	9,09 ± 0,78	
		0,0494	0,5660	10,46		
	DexOx (20% (m/m)) +	AAD (10%)	0,0404	0,5924	13,66	11,89 ± 0,52
		β -TCP (1%(m/v))	0,0404	0,5502	12,62	
	AAD (10%)	0,0479	0,6373	12,30	9,09 ± 1,20	
		nHAp (1%(m/v))	0,0567	0,6178		9,90
	AAD (20%)	0,0588	0,5384	8,16	11,89 ± 0,20	
		β -TCP (1%(m/v))	0,0573	0,5018		7,76
	AAD (20%)	0,0439	0,5657	11,89	9,09 ± 1,40	
		nHAp (1% (m/v))	0,0538	0,5429		9,09
5	DexOx (20% (m/m)) +	AAD (10%)	0,0247	0,1662	5,73	6,43 ± 0,70
		AAD (10%)	0,0226	0,1839	7,14	
		AAD (20%)	0,0227	0,1824	7,04	

		0,0313	0,2515	7,04		
	AAD (10%)	0,0272	0,2430	7,93		
	β-TCP (1%(m/v))	0,0252	0,2198	7,72	$7,83 \pm 0,11$	
	AAD (10%)	0,0254	0,2922	10,50		
	nHAp (1%(m/v))	0,0183	0,1582	7,64	$9,07 \pm 1,43$	
	AAD (20%)	0,0265	0,2485	8,38		
	β-TCP (1%(m/v))	0,0298	0,2769	8,29	$8,33 \pm 0,04$	
	AAD (20%)	0,0285	0,2182	6,66		
	nHAp (1% (m/v))	0,0274	0,2304	7,41	$7,03 \pm 0,38$	
	AAD (10%)	0,0235	0,1314	4,59		
		0,0130	0,0580	3,46	$4,03 \pm 0,56$	
	AAD (20%)	0,0283	0,2323	7,21		
		0,0270	0,2203	7,16	$7,18 \pm 0,02$	
	AAD (10%)	0,0157	0,1050	5,69		
	β-TCP (1%(m/v))	0,0175	0,1260	6,20	$5,94 \pm 0,26$	
2	DexOx (20% (m/m)) +	AAD (10%)	0,0167	0,1219	6,30	
		nHAp (1%(m/v))	0,0191	0,1294	5,77	$6,04 \pm 0,26$
		AAD (20%)	0,0292	0,2358	7,08	
		β-TCP (1%(m/v))	0,0293	0,2378	7,12	$7,10 \pm 0,02$
		AAD (20%)	0,0253	0,1842	6,28	
		nHAp (1% (m/v))	0,0314	0,2031	5,47	$5,87 \pm 0,41$

^a A percentagem de AAD é calculada em base molar tendo em conta o número de resíduos de glucose no Dex original.

Anexo E – Rearranjo de Amadori

Na Figura E.1 é possível observar uma representação esquemática do rearranjo de Amadori e a cisão do anel glicosídico. [64]

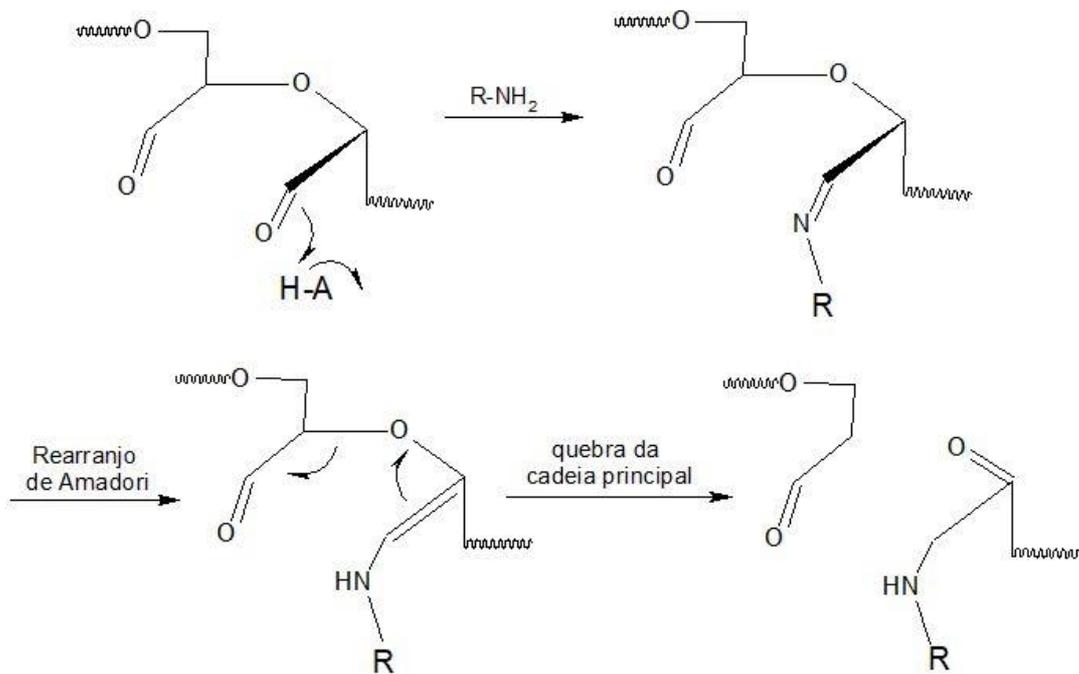


Figura E.1 - Representação esquemática do rearranjo de Amadori e cisão do anel glicosídico. (adaptado de [62]).

Anexo F – Resultados dos testes de Viabilidade Celular

Na Figura F.1 é possível observar os registros de imagem obtidos no ensaio de biocompatibilidade.

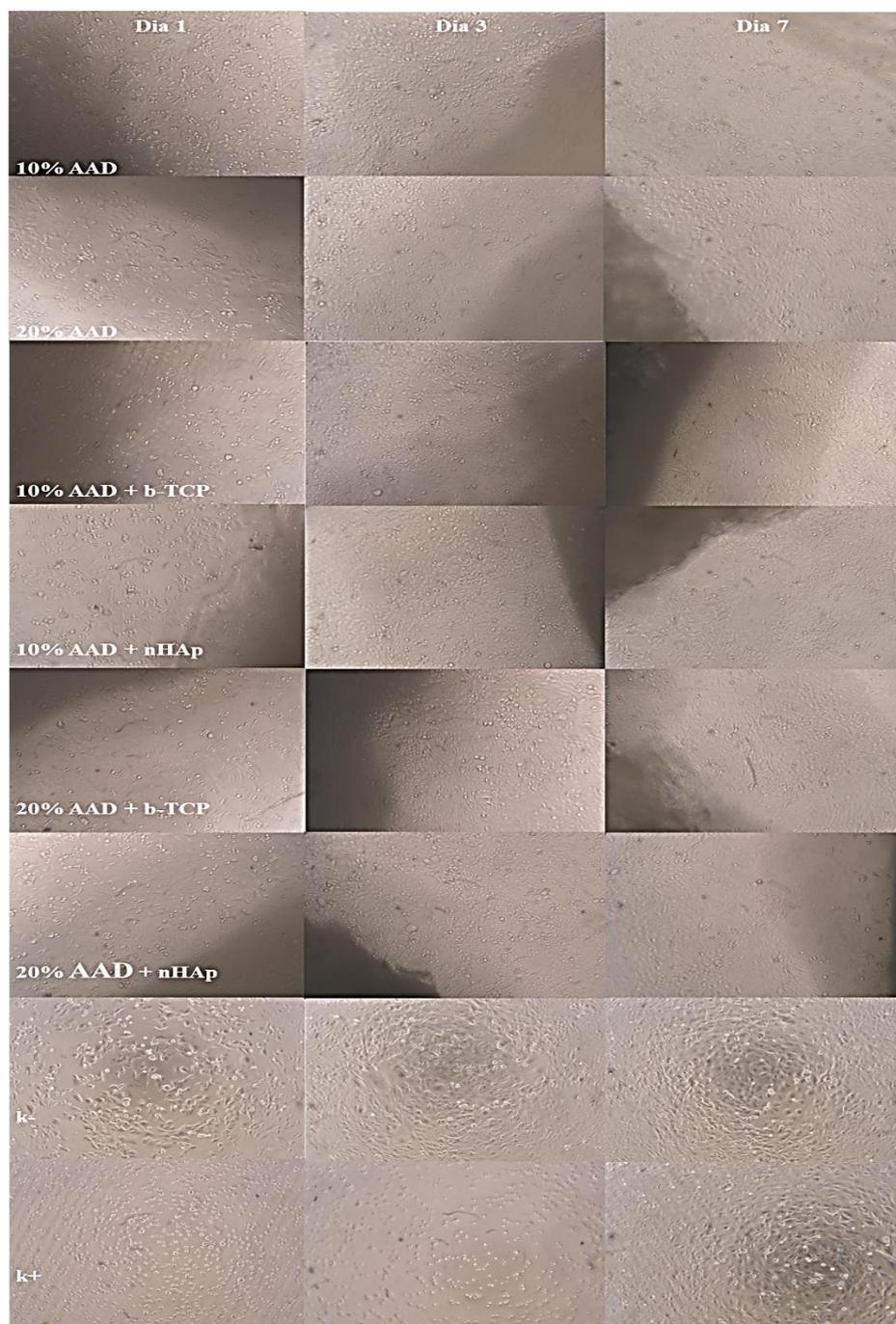


Figura F.1 - Resultados de imagem do teste de Viabilidade Celular.