



**TECNOLOGIA
SETÚBAL**

ESCOLA SUPERIOR
POLITÉCNICO SETÚBAL



SAÚDE

ESCOLA SUPERIOR
POLITÉCNICO SETÚBAL

ÂNGELA DA
CONCEIÇÃO
FERNANDES
JUSTINO

DESENVOLVIMENTO DE FILMES PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Relatório de Dissertação do Mestrado em Engenharia
Biomédica

ORIENTADOR

Professor Doutor Ricardo Baptista

CO-ORIENTADORES

Professora Doutora Helena Caria

Professora Doutora Susana Silva

Dezembro de 2023

ÂNGELA DA
CONCEIÇÃO
FERNANDES
JUSTINO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES
PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

JÚRI

Presidente: Professor Doutor Célio Pina, IPS

Orientador: Professor Doutor Ricardo Baptista, ISEL

Vogal: Professora Doutora, Mafalda Guedes, ISEL

Dezembro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço do fundo do coração a todas as instituições que tornaram possível a realização deste trabalho de investigação. A conclusão desta tese marca não apenas o fim de um ciclo académico, mas também a concretização de um esforço coletivo que envolveu diversas entidades, sem as quais este projeto não teria sido bem-sucedido.

Primeiramente, expresso a minha sincera gratidão à minha universidade, o Instituto Politécnico de Setúbal, onde tenho o privilégio de estudar há cinco anos. O ambiente académico estimulante, os recursos disponíveis e o apoio contínuo da faculdade foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Não posso deixar de expressar o meu apreço ao Instituto Superior Técnico, em especial ao Engenheiro Sérgio Gonçalves, pelos contributos nos ensaios de tração e à Doutora Diana Silva pelo trabalho nos ensaios reológicos. A colaboração com esta instituição enriqueceu o meu trabalho, oferecendo recursos essenciais para a realização de ensaios.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa, expresso o meu sincero agradecimento pela disponibilidade do laboratório e pelo conhecimento dos profissionais envolvidos, em particular da Professora Doutora Ana Patrícia Almeida e do Professor Doutor Pedro Almeida, que desempenharam um papel fundamental nos ensaios de molhabilidade por ângulo de contato. A sua colaboração foi crucial para a obtenção de resultados nesta área específica de pesquisa.

Um reconhecimento bastante especial ao Centro de Estudos em Doenças Crónicas da Universidade NOVA de Lisboa, pelo apoio e colaboração nos ensaios biológicos. Agradeço, em particular, à coorientadora Professora Doutora Susana Silva pela prontidão, dedicação e sabedoria que foram essenciais para o sucesso deste estudo. A sua paixão pelo conhecimento e a sua capacidade em transmitir conceitos complexos de forma acessível foram verdadeiramente inspiradoras, tornando o processo de aprendizagem não apenas educativo, mas também cativante. Agradeço por ser uma mentora exemplar, cujo compromisso com a excelência académica e capacidade de motivar os alunos desempenharam um papel bastante importante na realização deste trabalho. Agradeço também à Professora Doutora Mafalda Silva, pela sua disponibilidade e transmissão de conhecimento dos ensaios de proliferação celular.

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão ao meu orientador, o Professor Doutor Ricardo Baptista, cuja presença e orientação foram inestimáveis ao longo deste percurso académico. Agradeço pela sua calma, que proporcionou um ambiente sereno e propício ao desenvolvimento deste estudo. A sua tranquilidade perante desafios e a sua capacidade de transmitir confiança foram fundamentais para superar momentos de incerteza e dificuldade. A constante presença e disponibilidade do professor foram cruciais. Sempre atento às necessidades dos seus orientandos, dedicou tempo e esforço para assegurar que eu recebesse a orientação necessária, elementos essenciais para o sucesso deste projeto. Agradeço por liderar este caminho

com sabedoria, paciência e dedicação. Este trabalho não teria alcançado o nível que atingiu sem a sua orientação dedicada ao longo desta jornada acadêmica.

Quero expressar a minha gratidão à minha coorientadora Professora Doutora Helena Caria pela sua orientação e apoio durante a realização desta tese.

Um grande agradecimento aos meus pais. À medida que concluo esta grande etapa da minha jornada acadêmica, quero expressar um agradecimento conjunto, pois o vosso apoio foi a força motriz por trás desta realização. A ambos, agradeço por serem os pilares inabaláveis que sustentaram não apenas a minha tese, mas todo o percurso académico. A vossa orientação, encorajamento e amor foram fundamentais para superar desafios e celebrar triunfos. Agradeço cada palavra de incentivo, cada gesto de carinho e cada sacrifício feito para me apoiar são apreciados além das palavras. Esta conquista é uma celebração do amor, da dedicação e do apoio que tenho dos melhores pais do mundo. Agradeço por serem os alicerces desta jornada e por moldarem não apenas o académico, mas também o meu percurso como indivíduo.

É com imensa gratidão que escrevo estas palavras ao meu namorado, João Pires, reconhecendo o papel especial que desempenha na minha vida, especialmente durante este último período. Agradeço pela paciência, compreensão, carinho e apoio incondicional, verdadeiros presentes que enriqueceram a minha jornada.

Com profunda gratidão, dedico estas palavras de agradecimento a cada um de vocês, incluindo a Adriana, Marta, Margarida, Miguel e Sofia. Ao longo desta jornada académica, a vossa amizade e apoio foram fundamentais, tornando este percurso não apenas educativo, mas verdadeiramente enriquecedor. Juntos, formamos uma equipa incrível, enfrentando desafios, partilhando conquistas e criando memórias que perdurarão para sempre. Cada um de vocês contribuiu de forma única para o nosso percurso académico, transformando-o numa experiência inesquecível. Agradeço pela colaboração, pela amizade sincera e por serem parte fundamental desta etapa da minha vida. Que as nossas trajetórias continuem a cruzar-se, e que a amizade que cultivamos na faculdade perdure para além das salas de aula.

Por fim, expresso a minha gratidão a todos os professores, colegas, amigos e familiares que contribuíram de alguma forma para esta jornada. O vosso apoio moral e incentivo foram fundamentais para ultrapassar os desafios encontrados ao longo deste percurso académico.

[DESENVOLVIMENTO DE FILMES PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA]

RESUMO

A regeneração óssea constitui um campo de crescente importância tendo em conta as limitações inerentes às abordagens tradicionais, utilizadas no tratamento de lesões ósseas. Nesse contexto, surge a necessidade de desenvolver soluções inovadoras e eficazes para a restauração do tecido ósseo danificado. O potencial impacto deste estudo é de magnitude considerável, uma vez que se apresenta como uma possível via para melhorar a qualidade de vida dos doentes que enfrentam lesões ósseas, acelerando o processo de recuperação e mitigando as complicações associadas.

O principal objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de filmes compostos à base de biomateriais, com o propósito de servir como estrutura de suporte à regeneração do tecido ósseo. Para tal, foram desenvolvidas formulações e processos de fabrico destes filmes, seguindo-se a avaliação das suas propriedades físicas, químicas e biológicas, visando determinar a sua eficácia como estruturas que promovam a regeneração óssea. Foram produzidas três composições base dos filmes, fazendo variar as percentagens de alginato e ι-carragenina, possibilitando assim, analisar o impacto da composição base no resultado final. Adicionalmente, foram exploradas duas metodologias para a incorporação de hidroxiapatite (HA) nos filmes: a suspensão direta de HA nas soluções filmogénicas e a deposição da HA durante o processo de cura. O processo de cura compreendeu a imersão de uma ou ambas as faces do filme numa solução de cloreto de cálcio.

Os resultados indicam que a composição mais eficaz foi a 75%/25%. Além disso, a cura em ambas as faces do filme proporcionou, em geral, melhores resultados, atingindo um módulo de elasticidade de 6794 MPa e uma tensão de carga máxima de 66 MPa. A inclusão de HA na composição dos filmes resultou numa redução de aproximadamente 65 % do módulo de elasticidade, no entanto, a incorporação de HA na solução de cura demonstrou melhorias nos ensaios de molhabilidade, com um ângulo de contacto mínimo de 9,0 °. Por fim, os ensaios biológicos validaram os filmes como uma alternativa viável para a regeneração óssea, evidenciando a adesão e proliferação celular. O filme que se destacou com melhores resultados foi o filme 75-25-C2L, apresentando uma viabilidade média de 84%, contribuindo assim para avanços práticos e inovadores no campo dos biomateriais para aplicações ortopédicas e traumáticas.

PALAVRAS-CHAVE

Regeneração óssea; Biomateriais; Filmes compostos; Alginato; Carragenina; Hidroxiapatite; Lesões ósseas.

[DEVELOPMENT OF FILMS FOR BONE REGENERATION]

ABSTRACT

Bone regeneration constitutes a field of growing importance, due to the inherent limitations of traditional approaches used in the treatment of bone injuries. In this context, the need to develop innovative and effective solutions for the restoration of damaged bone tissue arises. The potential impact of this study is of considerable magnitude, as it presents itself as a possible avenue to enhance the quality of life for patients facing bone injuries, by accelerating the recovery process and mitigating associated complications.

The primary objective of this work is the development of films composed of biomaterials, intended to serve as support structures for bone tissue regeneration. To achieve this, formulations and manufacturing processes of the films were developed, followed by the assessment of their physical, chemical, and biological properties, aiming to determine their effectiveness as structures promoting bone regeneration.

Three base compositions of the films were produced, varying the percentages of alginate and carrageenan, thereby enabling an analysis of the impact of the base composition on the final outcome. Additionally, two methodologies for the incorporation of HA into the films were explored: the direct suspension of HA in the filmogenic solutions and the deposition of HA during the curing process. The curing process involved the immersion of one or both film faces in a solution of calcium chloride.

The results indicate that the most effective composition was 75%/25%. Furthermore, curing on both sides of the film generally yielded better results, reaching an elasticity modulus of 6794 MPa and a maximum load stress of 66 MPa. The inclusion of HA in the film composition resulted in a reduction of approximately 65% in the elasticity modulus; however, incorporating HA into the curing solution demonstrated improvements in wettability tests, with a minimum contact angle of 9.0°. Finally, biological assays validated the films as a viable alternative for bone regeneration, highlighting cell adhesion and proliferation. The film that stood out with the best results was the 75-25-C2L film, presenting an average viability of 84%, thus contributing to practical and innovative advances in the field of biomaterials for orthopedic and traumatic applications.

KEYWORDS

Bone regeneration; Biomaterials; Composite films; Alginate; Carrageenan; Hydroxyapatite; Bone injuries.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ENQUADRAMENTO.....	1
1.2	OBJETIVOS.....	2
1.3	ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO	2
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	ESTRUTURA DO OSSO.....	3
2.1.1	<i>Osso Cortical</i>	4
2.1.2	<i>Osso Trabecular</i>	4
2.1.3	<i>Osso Subcondral</i>	5
2.1.4	<i>Periósteo</i>	5
2.1.5	<i>Endósteo</i>	6
2.2	COMPOSIÇÃO DO OSSO.....	6
2.2.1	<i>Matriz Óssea</i>	6
2.2.2	<i>Células do Osso</i>	7
2.3	REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	10
2.4	CICATRIZAÇÃO ÓSSEA	11
2.5	DEFEITOS ÓSSEOS	12
2.5.1	<i>Considerações Iniciais</i>	12
2.5.2	<i>Situações de trauma</i>	13
2.5.3	<i>Defeitos associados a um contexto fisiopatológico</i>	13
2.6	SOLUÇÕES TERAPÊUTICAS E ESTRATÉGIAS DE REGENERAÇÃO.....	14
2.6.1	<i>Considerações iniciais</i>	14
2.6.2	<i>Enxertos Ósseos</i>	15
2.6.3	<i>Materiais para manutenção e substituição de propriedades mecânicas</i>	16
2.6.4	<i>Materiais de enchimento</i>	16
2.6.5	<i>Engenharia de Tecido Ósseo</i>	17
2.6.6	<i>Métodos de fabrico</i>	18
2.7	BIOMATERIAIS EM REGENERAÇÃO ÓSSEA	19
2.7.1	<i>Considerações iniciais</i>	19
2.7.2	<i>Alginato</i>	20
2.7.3	<i>ι -carragenina</i>	20
2.7.4	<i>Hidroxiapatite</i>	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	MATERIAIS	23
3.2	PREPARAÇÃO DOS FILMES.....	23
3.2.1	<i>Procedimento experimental</i>	23
3.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES.....	25

3.3.1	<i>Microscopia eletrónica de varrimento</i>	25
3.3.2	<i>Ensaaios reológicos</i>	25
3.3.3	<i>Ensaaios de tração</i>	26
3.3.4	<i>Molhabilidade por ângulo de contacto</i>	26
3.3.5	<i>Testes de absorção</i>	27
3.3.6	<i>Teste de degradação</i>	27
3.4	TESTES <i>IN-VITRO</i>	28
3.4.1	<i>Cultura de células</i>	28
3.4.2	<i>Viabilidade celular</i>	29
3.4.3	<i>Proliferação celular</i>	29
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4	APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS	31
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	31
4.1.1	<i>Microscopia eletrónica de varrimento</i>	31
4.1.2	<i>Ensaaios reológicos</i>	35
4.1.3	<i>Ensaaios de tração</i>	36
4.1.4	<i>Molhabilidade por ângulo de contacto</i>	39
4.1.5	<i>Testes de absorção</i>	41
4.1.6	<i>Teste de degradação</i>	44
4.2	TESTES <i>IN-VITRO</i>	46
4.2.1	<i>Viabilidade celular</i>	46
4.2.2	<i>Análise morfológica da cultura celular</i>	49
4.2.3	<i>Proliferação celular</i>	50
5	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	53
5.1	SÍNTESE DO TRABALHO	53
5.2	CONCLUSÕES	55
5.3	PERSPETIVAS FUTURAS	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DO OSSO (ADAPTADO DE <i>SERVIER MEDICAL ART</i>)	3
FIGURA 2.2 - DIFERENCIAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEOCLASTOS (ADAPTADO DE ARBOLEYA & CASTAÑEDA, 2013)	8
FIGURA 2.3 – DESTINOS DA DIFERENCIAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEOBLASTOS (ADAPTADO DE ARBOLEYA & CASTAÑEDA, 2013).....	9
FIGURA 2.4 - PROCESSO DE REMODELAÇÃO ÓSSEA (ADAPTADO DE <i>SERVIER MEDICAL ART</i>)	11
FIGURA 2.5 - CICATRIZAÇÃO ÓSSEA (ADAPTADO DE <i>SERVIER MEDICAL ART</i>).....	12
FIGURA 3.1 - PROCESSO DE FABRICO DOS FILMES	23
FIGURA 3.2 - PROCESSO DE CURA DOS FILMES	25
FIGURA 3.3 - PROCESSO DE CULTURA CELULAR	28
FIGURA 4.1 - MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES, COM AMPLIAÇÃO 200X, A) 75-25-C1L, B) 50-50-C1L, C) 25-75-C1L, D) 75-25-C2L, E) 50-50-C2L, F) 25-75-C2L, G) 75-25-HA-C2L, H) 50-50-HA-C2L E I) 25-75-HA-C1L, J) 75-25-C1L-HA, K) 50-50-C1L-HA E L) 25-75-C1L-HA.....	32
FIGURA 4.2 - MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES, COM AMPLIAÇÃO 2000X, A) 75-25-C1L, B) 50-50-C1L, C) 25-75-C1L, D) 75-25-C2L, E) 50-50-C2L, F) 25-75-C2L, G) 75-25-HA-C2L, H) 50-50-HA-C2L E I) 25-75-HA-C1L, J) 75-25-C1L-HA, K) 50-50-C1L-HA E L) 25-75-C1L-HA.....	33
FIGURA 4.3 - MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO DA SECÇÃO TRANSVERSAL DOS FILMES, COM AMPLIAÇÃO 100X, A) 50-50-C2L, B) 50-50-HA-C2L, C) 50-50-C1L-HA	34
FIGURA 4.5 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES A) SEM HA E B) COM HA, COM CONCENTRAÇÕES RELATIVAS DE ALGINATO/I-CARRAGENINA 75%/25%, 50%/50% E 75%/25%.....	35
FIGURA 4.4 - ÂNGULOS DE CONTACTO DOS FILMES SEM HA (C1L), SEM HA (C2L), COM HA (HA-C2L) E C1L-HA	40
FIGURA 4.6 - RESULTADOS DO ENSAIO DE ABSORÇÃO: A) SEM HA (C1L); B) SEM HA (C2L); C) COM HA (HA-C1L); D) COM HA (HA-C2L); E) C1L-HA	42
FIGURA 4.7 - COMPORTAMENTO DE DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i> , NOS FILMES SEM HA (C1L), SEM HA (C2L), COM HA (HA-C1L), COM HA (HA-C2L) E C1L-HA	45
FIGURA 4.8 - RESULTADOS DO ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR NOS FILMES SEM HA (C1L), SEM HA (C2L), COM HA (C1L), COM HA (C2L) E C1L-HA, APÓS 48 HORAS.....	46
FIGURA 4.9 - MORFOLOGIA DAS CÉLULAS, COM AMPLIAÇÃO 50X, DOS FILMES SEM HA (C1L), SEM HA (C2L), COM HA (HA-C1L), COM HA (HA-C2L) E C1L-HA, APÓS 24 HORAS (A), B), C), G), H) E I), RESPETIVAMENTE) E 48 HORAS (D), E), F), J), K) E L), RESPETIVAMENTE)	49
FIGURA 4.10 - RESULTADOS DO ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS FILMES A) SEM HA (C1L), B) SEM HA (C2L), C) COM HA (HA-C1L), D) COM HA (HA-C2L) E E) C1L-HA, APÓS 48 HORAS	51

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2.1 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DO OSSO CORTICAL E TRABECULAR (LeGEROS & LeGEROS, 1993)	5
TABELA 2.2 - PROPRIEDADES FÍSICAS DA HA (He ET AL., 2008)	7
TABELA 3.1 - COMPOSIÇÃO DOS FILMES (SEM HA (C2L, C1L), COM HA (HA-C2L, HA-C1L) E C1L-HA)	24
TABELA 4.1 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE TRAÇÃO NOS FILMES PRODUZIDOS, TENSÃO DE CARGA MÁXIMA, EXTENSÃO DE FRATURA, TENSÃO DE CEDÊNCIA E MÓDULO DE <i>YOUNG</i>	37

LISTA DE SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

BMP - *Bone Morphogenetic Proteins* - Proteína Morfogenética Óssea

CTM - Célula-Tronco Mesenquimais

CTH - Célula-Tronco Hematopoéticas

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DBM - *Demineralized Bone Matrix* - Matriz Óssea Desmineralizada

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EGF - *Epidermal Growth Factor* - Fator Crescimento Epidérmico

HA - Hidroxiapatite

CT - Cultura de Tecidos

LE - Limite Elástico

PBS - *Phosphate-Buffered Saline* - Solução Salina Tamponada com Fosfato

PVP - Polivinilpirrolidona

Rpm - Rotações por minuto

TCP - Trifosfato de Cálcio

TGF - *Transforming Growth Factor* - Fator de Crescimento Transformante

UV - Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento

A regeneração óssea representa um campo de investigação e desenvolvimento de crescente interesse e relevância no âmbito da medicina regenerativa. Nos últimos anos, a crescente procura por soluções inovadoras destinadas ao tratamento de lesões e defeitos ósseos tem suscitado uma investigação cada vez mais aprofundada em relação a materiais e métodos com capacidade de promover eficazmente a regeneração do tecido ósseo. Nesse contexto, o presente trabalho foca-se no desenvolvimento de filmes à base de alginato, ι-carragenina e hidroxiapatite (HA) como uma abordagem inovadora para a regeneração da superfície óssea.

A regeneração óssea desempenha uma função essencial na qualidade de vida dos pacientes que enfrentam lesões ósseas, fraturas ou defeitos estruturais. Embora as abordagens convencionais tenham demonstrado a sua eficácia em numerosos cenários, é importante destacar que existem limitações, sobretudo em situações que envolvem consideráveis perdas de tecido ósseo. Portanto, a investigação direcionada ao desenvolvimento de materiais inovadores e métodos avançados destinados a facilitar a regeneração do tecido ósseo assume um grau de elevada importância.

A relevância deste estudo centra-se na necessidade de desenvolvimento de soluções terapêuticas mais eficazes e inovadoras destinadas ao tratamento de lesões ósseas. Tais soluções almejam acelerar o processo de cicatrização, minimizar possíveis complicações e, por conseguinte, melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados por tais condições. Nesse contexto, os filmes compostos por alginato, ι-carragenina e hidroxiapatite destacam-se como uma alternativa promissora para promover a regeneração óssea, caracterizando-se pela sua biocompatibilidade e capacidade de fornecer suporte estrutural.

Os filmes apresentam versatilidade em aplicações práticas, podendo ser adaptados às particularidades de cada cenário clínico. Em intervenções cirúrgicas, os estes podem ser colocados sobre o defeito ósseo, proporcionando suporte estrutural imediato. Esta estratégia é facilitada pela formulação dos filmes em formatos que se ajustam facilmente ao local, promovendo assim uma libertação controlada de fatores de crescimento e substâncias bioativas ao longo do tempo. Estas características, juntamente com a capacidade intrínseca dos filmes para criar um ambiente propício ao crescimento celular, realçam a sua aplicabilidade prática e a eficácia na indução da regeneração óssea.

1.2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é a elaboração de filmes à base de alginato, ι-carragenina e HA, com particular destaque para a sua aplicação na promoção da regeneração óssea.

Para atingir esse objetivo, foi desenvolvido um procedimento experimental que envolve a formulação e caracterização dos filmes produzidos, com variações em composição e métodos de fabricação. Adicionalmente, o estudo incluirá testes *in vitro* com o propósito de avaliar a biocompatibilidade, capacidade de osteoindução e integração com o tecido ósseo circundante. Será utilizada uma abordagem interdisciplinar, que incorpora princípios da química de materiais, engenharia de tecidos e da medicina regenerativa.

Como objetivos secundários, destacam-se a análise do impacto da composição do filme base na morfologia e nas propriedades físico-químicas dos filmes produzidos. Além disso, pretende-se compreender como a técnica de fabrico dos filmes e a forma como HA é incorporada nos mesmos influenciam as características finais. Adicionalmente, pretende-se selecionar uma composição e uma metodologia de fabrico dos filmes otimizadas para serem posteriormente utilizadas em trabalhos futuros.

1.3 Organização do documento

A presente dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos principais, sendo o presente a introdução, contendo uma contextualização do tema e a importância do estudo.

No segundo capítulo, apresenta-se uma revisão bibliográfica onde se descrevem as principais características do osso, nomeadamente a sua estrutura e composição. São ainda abordados os processos de remodelação e cicatrização óssea, bem como possíveis defeitos ósseos, soluções terapêuticas e estratégias de regeneração associadas a estes.

O terceiro capítulo descreve as metodologias adotadas para a preparação e caracterização morfológica e físico-química dos filmes, tendo em conta, os diferentes ensaios realizados.

No quarto capítulo efetua-se a análise dos resultados obtidos, comparando-os com os resultados indicados pela literatura.

No quinto e último capítulo, são apresentadas as conclusões do trabalho, indicando algumas perspetivas de desenvolvimentos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura do osso

O tecido ósseo é um componente essencial do sistema esquelético humano e divide-se em três principais tipos morfológicos: osso trabecular (esponjoso), osso cortical (compacto) e osso subcondral. O osso esponjoso ocupa a região interna, enquanto o osso compacto constitui a camada externa. O osso subcondral, uma camada de tecido ósseo liso, reside nas epífises dos ossos, geralmente revestido por cartilagem articular, desempenhando um papel fundamental na regeneração cartilaginosa (Boskey & Posner, 1984). Pela Figura 2.1 é possível observar a estrutura e composição do osso.

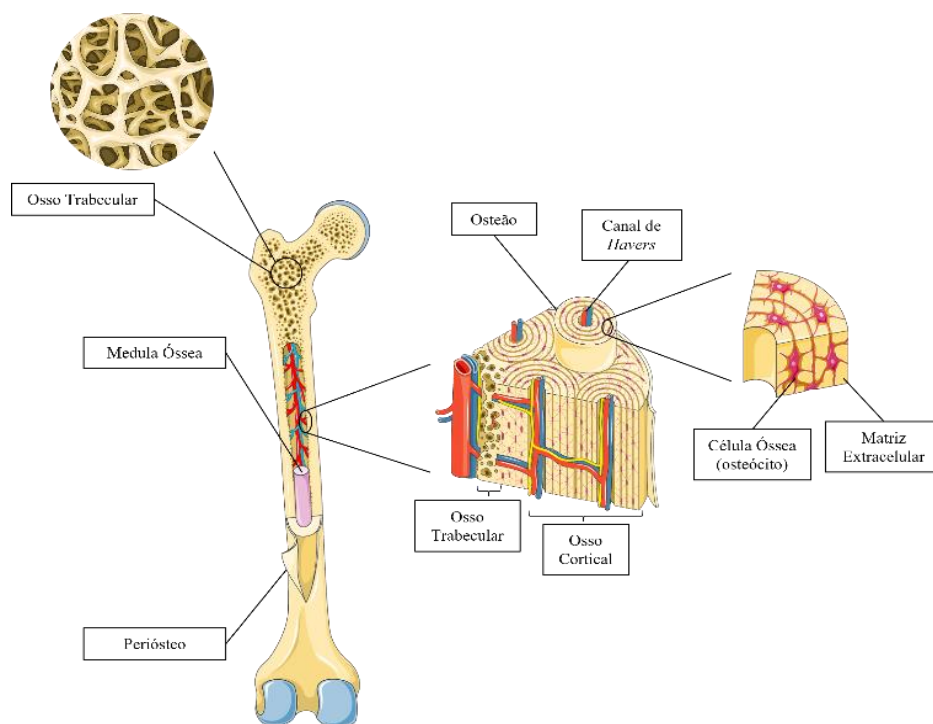


Figura 2.1 - Estrutura e composição do osso (adaptado de *Servier medical art*)

A relação proporcional entre osso trabecular e osso cortical varia entre 20% e 80% em diferentes regiões do sistema esquelético, dependendo da sua localização anatômica. A principal distinção entre esses tipos de tecido ósseo é caracterizada pela densidade e porosidade, sendo o osso trabecular altamente poroso e o osso cortical densamente compacto. O osso cortical desempenha principalmente uma função de sustentação e proteção contra as tensões mecânicas, enquanto o osso trabecular está metabolicamente ativo, participando na regulação do metabolismo do cálcio e na hematopoese (Eriksen et al., 1993).

A estrutura do osso é caracterizada por vários níveis de organização, segundo Francillon-Vieillot et al., (1990) existem quatro níveis, que compreendem a macroestrutura, a microestrutura, a sub-microestrutura e a nanoestrutura.

Macroestrutura (~1 m – 1 mm): Organização geral do osso em escala macroscópica, influenciada por fatores filogenéticos, ontogenéticos, mecânicos e ambientais.

Microestrutura (1 mm – 100 µm): Análise das unidades estruturais fundamentais do osso, como osteonas ou sistemas de *Havers*, numa escala microscópica.

Sub-microestrutura (1000 µm – 1 µm): Investigação de níveis de organização ainda menores, incluindo as fibras de colagénio nas lamelas da matriz óssea, que desempenham um papel crucial na resistência e flexibilidade do tecido ósseo.

Nanoestrutura (1 µm – 10 nm): Concentra-se na organização em escala nanométrica e investiga componentes moleculares, como cristais de hidroxiapatite e proteínas envolvidas na mineralização e regeneração óssea.

2.1.1 Osso Cortical

O osso cortical, responsável pela maior parte do peso do esqueleto (até 80%), possui uma mineralização de aproximadamente 95% e uma porosidade variando de 5% a 30% (Samuel et al., 2009).

Este exibe uma estrutura organizada em lamelas concêntricas, constituindo unidades cilíndricas denominadas sistemas de *Havers* ou osteões, conforme ilustrado na Figura 2.1. Cada osteão é composto por lamelas ósseas que circundam um canal central denominado canal de *Havers*, o qual contém vasos sanguíneos, células do tecido conjuntivo e fibras nervosas. Os osteócitos, células maduras do tecido ósseo, ocupam lacunas entre as lamelas e estabelecem conexões intercelulares através de canalículos, possibilitando a troca de nutrientes e sinais intracelulares. Adicionalmente, canais de *Volkmann* atravessam os osteões em ângulos perpendiculares, assegurando a vascularização e nutrição do tecido do osso cortical (Tang, 2017).

A organização estratificada, a presença de canais comunicantes e a vascularização coordenada contribuem para as propriedades mecânicas distintivas do osso cortical, sendo este predominantemente localizado na periferia dos ossos, nas diáfises dos ossos longos e na camada externa mais fina de ossos curtos e planos (Samuel et al. (2009); Tang (2017)).

2.1.2 Osso Trabecular

O osso trabecular, é uma estrutura tridimensional altamente porosa composta por trabéculas lamelares. A porosidade exibe uma variação significativa, abrangendo um intervalo que varia de 30% a 95% (Samuel et al., 2009).

Este tecido altamente poroso encontra-se na medula óssea, desempenhando um papel crucial na hematopoiese e na produção de células do sistema imunológico. À medida que o indivíduo envelhece, a medula óssea começa a acumular lípidos, resultando na transformação para a designada medula óssea amarela (Goswami, 2016).

O osso trabecular localiza-se circundado pelo osso cortical, como mostra a Figura 2.1, e é encontrado em quantidades reduzidas no centro da diáfise dos ossos longos. No entanto, este predomina nas regiões da metáfise e epífise desses ossos, onde desempenha um papel fundamental no suporte de tensões mecânicas.

Na Tabela 2.1 encontram-se apresentadas as propriedades mecânicas do osso cortical e do osso trabecular.

Tabela 2.1 - Propriedades mecânicas do osso cortical e trabecular (LeGeros & LeGeros, 1993)

Propriedades	Osso Cortical	Osso Trabecular
Resistência à Compressão [MPa]	100 - 230	2 - 12
Resistência à Tração e Flexão [MPa]	50 - 150	10 - 20
Deformação até fratura [%]	1 - 3	5 - 7
Módulo de Young [GPa]	7 - 30	0,05 - 0,9

2.1.3 Osso Subcondral

O tecido ósseo subcondral, situado adjacente à cartilagem articular nas articulações, desempenha um papel fundamental no fornecimento de suporte estrutural e estabilidade a essas estruturas. Este tipo de tecido ósseo exibe características que são uma combinação do tecido ósseo compacto e do tecido ósseo esponjoso, geralmente apresentando maior densidade nas regiões submetidas a pressão mecânica direta (Zhu et al., 2021).

2.1.4 Perióstio

O perióstio é uma membrana de tecido conjuntivo fibroso que reveste a superfície externa de todos os ossos do corpo, exceto as superfícies articulares. Este atua como uma camada de transição entre o osso cortical e os tecidos moles, dividindo-se em duas camadas distintas (Buckwalter & Cooper, 1987).

Camada fibrosa externa:

Esta camada é constituída por tecido conjuntivo denso e irregular, caracterizado por uma matriz rica em colagénio e uma menor densidade de células. Esta subdivide-se numa camada superficial altamente vascularizada, que recebe os vasos periosteais, e em uma camada interna composta por tecido fibroelástico (Squier et al., 1990).

Camada Celular Interna (Camada Interna do Câmbio):

A camada celular interna encontra-se em contacto direto com o osso. Esta camada é caracterizada pela presença de numerosos vasos sanguíneos, fibroblastos e uma rede densa de fibras de colagénio conhecidas como "fibras de Sharpey," que sustentam o perióstio ao tecido ósseo. Além disso, a camada interna contém células-tronco mesenquimais, células

osteoprogenitoras e pré-osteoblastos, desempenhando um papel crucial no crescimento adicional e na reparação do tecido ósseo (Khurana, 2009).

A espessura do periósteo varia ao longo da vida, sendo mais pronunciada nos primeiros anos de desenvolvimento e tendendo a diminuir com o envelhecimento. A sua espessura pode também variar dependendo da localização no osso. De notar que os ossos sesamoides são uma exceção, pois não possuem periósteo (Uddströmer, 1978).

2.1.5 Endósteo

O endósteo é uma membrana fina que reveste a superfície interna dos ossos, contemplando as cavidades do osso trabecular e a cavidade da medula óssea. O endósteo reveste o canal de *Havers* e todas as cavidades internas do osso. Composta por uma única camada de células osteoprogenitoras e fibras de colagénio do tipo III (fibras reticulares), responsáveis por formar osteoblastos e osteoclastos, desempenhando um papel importante na regulação e manutenção do tecido ósseo. O endósteo é mais fino que o periósteo (Boskey & Posner, 1984).

2.2 Composição do osso

2.2.1 Matriz Óssea

A matriz óssea é uma substância complexa e altamente organizada que constitui a estrutura fundamental dos ossos. Esta tem como função principal conferir propriedades biomecânicas e bioquímicas ao tecido ósseo. A matriz é composta por dois componentes primários, nomeadamente: componentes orgânicos e inorgânicos, representando, respetivamente, 30% e 60% da composição do tecido ósseo, enquanto os restantes 10% consistem em água (Feng, 2009).

A dureza e rigidez do osso são atribuídas à presença de sais minerais na matriz osteóide. Esses sais minerais formam uma estrutura cristalina complexa composta por cálcio e fosfato, conhecida como hidroxiapatite (Clarke, 2008).

2.2.1.1 Matriz Orgânica

A matriz orgânica corresponde a 30% da massa do osso desidratado e é predominantemente constituída por colagénio, representando 90%, nomeadamente do tipo I, enquanto as proteínas não colagénicas compreendem os restantes 10% (Sroga et al., 2011). Estas proteínas desempenham um papel fundamental na organização da matriz, atuando como iniciadoras do processo de deposição de cristais de hidroxiapatite na matriz durante a mineralização óssea e influenciando o comportamento das células ósseas (Boskey, 1989). Adicionalmente, a matriz extracelular orgânica também inclui, em proporções inferiores, colagénio dos tipos III e V, os quais desempenham um papel na regulação da formação de fibrilas e na modulação de seu diâmetro (Lin et al., 2020).

A matriz orgânica do osso desempenha um papel na determinação da morfologia óssea, atuando como um reservatório de fatores de crescimento que auxiliam no processo de remodelação óssea. Além disso, essa matriz influencia a resistência mecânica do tecido ósseo como um todo. A interação entre a matriz orgânica e os minerais inorgânicos é crucial para a formação e manutenção da saúde óssea.

2.2.1.2 Matriz Inorgânica

Os constituintes inorgânicos que integram a matriz óssea consistem predominantemente em fosfato de cálcio, formando cristais de hidroxiapatite de acordo com a fórmula química $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (Marcus et al., 2007). Estes cristais são depositados e incorporados às fibras de colagénio, alinhando-se de maneira paralela, conferindo ao osso elevada dureza e resistência à compressão (ver Tabela 2.2 para detalhes sobre resistência à compressão).

A composição inorgânica da matriz óssea é dinâmica, sujeita a processos contínuos de remodelação ao longo da vida. Durante fases de crescimento, cicatrização de lesões ou em resposta a estímulos hormonais, a matriz óssea adapta-se de forma dinâmica, ajustando a quantidade e a disposição dos cristais de hidroxiapatite para atender às solicitações biomecânicas em constante evolução (Buckwalter & Cooper, 1987).

Importa salientar que, além do cálcio e do fosfato, a componente mineral da matriz óssea também incorpora a presença de íons de sódio e magnésio. A libertação controlada desses íons assegura níveis plasmáticos adequados, desempenhando funções vitais, como a condução nervosa e contração muscular (Marcus et al., 2007).

Tabela 2.2 - Propriedades físicas da HA (He et al., 2008)

Densidade [g/cm³]	Módulo de Young [GPa]	Resistência à Tração [MPa]	Resistência à Flexão [MPa]	Resistência à Compressão [MPa]
3,05 - 3,15	80 - 120	40 - 20	100 - 120	300 - 900

2.2.2 Células do Osso

A remodelação óssea é um processo contínuo e dinâmico que envolve a reabsorção do osso existente e a formação de novo tecido ósseo. Esse processo é estritamente regulado por uma variedade de células ósseas especializadas, cada uma com funções específicas na manutenção da saúde óssea. As principais células envolvidas na remodelação óssea incluem os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células do revestimento ósseo, todas provenientes de células-tronco mesenquimais (CTM) e células-tronco hematopoiéticas (CTH) (Clarke, 2008).

2.2.2.1 Osteoclastos

Os osteoclastos, derivados de células-tronco hematopoiéticas, desempenham um papel crucial no processo de remodelação óssea, sob a orientação de fatores de transcrição que promovem a proliferação e diferenciação dessas células. A formação dos osteoclastos ocorre no ambiente medular, sob a regulação dos osteoblastos (Baek & Kim, 2011).

Os precursores dos osteoclastos, denominados pré-osteoclastos, expressam na membrana o recetor ativador do fator nuclear κ B (RANK), cuja interação com o ligante de RANK (RANK-L) presente nos osteoblastos resulta na fusão desses precursores, formando osteoclastos multinucleados imaturos como mostra a Figura 2.2 (Arboleya & Castañeda (2013); Baek & Kim(2011)).

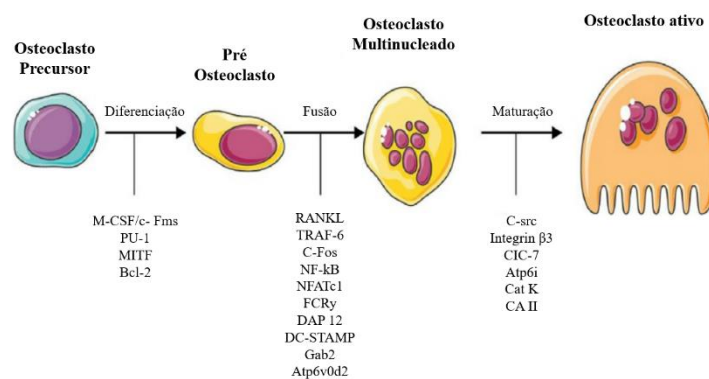


Figura 2.2 - Diferenciação e ativação de osteoclastos (adaptado de Arboleya & Castañeda, 2013)

A função primordial dos osteoclastos reside na reabsorção óssea, manifestada pela criação de lacunas de reabsorção (lacunas de *Howship*) no osso trabecular e no periósteo, ou pela formação de túneis de reabsorção no osso cortical. Este processo inclui a acidificação do meio pelos osteoclastos, mediante a libertação de prótons e íons cloreto [Cl⁻], formando ácido clorídrico [HCl] que dissolve os cristais de hidroxiapatite. Simultaneamente, enzimas como a catepsina K e collagenases desempenham papel crucial na degradação do colagénio tipo I da matriz óssea. A complexidade dessa reabsorção óssea é essencial para a manutenção da homeostase e integridade estrutural do esqueleto (Arboleya & Castañeda, 2013).

2.2.2.2 Osteoblastos

Os osteoblastos, derivados de células-tronco mesenquimais, assumem um papel fundamental no processo de formação e mineralização óssea. Este conjunto celular desempenha uma função central na síntese e deposição dos componentes essenciais da matriz óssea.

A diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos é mediada pelo fator de crescimento β (TGF- β) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), tais como, BMP2, BMP4 e BMP7. Estes sinais bioquímicos desencadeiam a ativação de genes específicos, impulsionando a produção de colagénio tipo I e proteínas não colagenadas (Arboleya & Castañeda (2013); Marie & Kassem (2011)).

Os osteoblastos, notáveis pela sua elevada atividade metabólica, possuem a capacidade de sintetizar colagénio tipo I, conhecido como osteóide, que é depositado na matriz óssea existente ou envolve os próprios osteoblastos, transformando-os em osteócitos. Esse processo envolve a libertação controlada de proteínas não colagenadas, induzindo a formação de cristais de hidroxiapatite entre as fibrilas de colagénio tipo I (Arboleya & Castañeda (2013); Marie & Kassem (2011)). Após essa fase, os osteoblastos têm três destinos principais: transformarem-se em osteócitos, células de revestimento ósseo ou passar por apoptose. Este processo encontra-se representado na Figura 2.3.

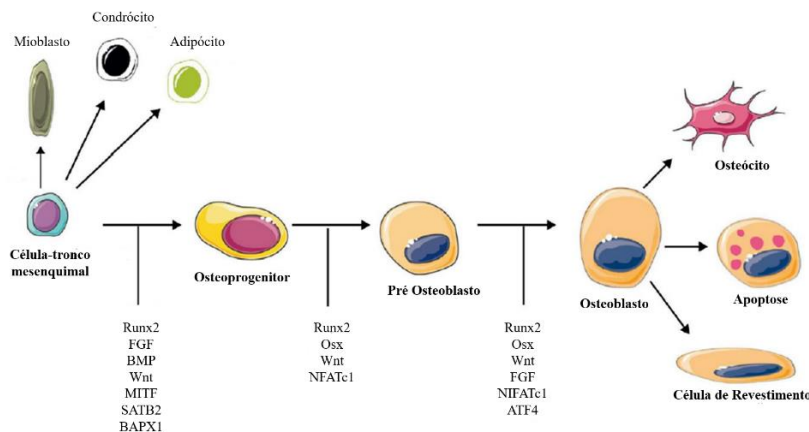


Figura 2.3 – Destinos da diferenciação e ativação de osteoblastos (adaptado de Arboleya & Castañeda, 2013)

2.2.2.3 Osteócitos

Os osteócitos, provenientes da diferenciação de osteoblastos, encontram-se na matriz mineralizada dos ossos, exercendo uma função vital na homeostase e adaptação do tecido ósseo. Estas células especializadas convertem estímulos mecânicos em sinais bioquímicos, que são posteriormente transmitidos a outras células adjacentes por meio de extensões citoplasmáticas (Baek & Kim (2011); Franz-Odenaal et al. (2006)).

Um aspeto fundamental dos osteócitos é a sua capacidade de deteção de microlesões no tecido ósseo. Ao identificar pequenas fraturas resultantes de forças mecânicas, os osteócitos iniciam processos de reparação, desencadeando respostas adaptativas. Os sinais bioquímicos por eles emitidos podem desencadear duas ações principais (Rubin & Lanyon, 1987):

- Estímulo à atividade dos osteoblastos e inibição dos osteoclastos, favorecendo o crescimento ósseo num contexto anabólico;
- Ativação da diferenciação dos osteoclastos e estímulo à sua proliferação, promovendo a reabsorção óssea como parte de um processo catabólico.

Dessa forma, os osteócitos desempenham um papel essencial na remodelação dinâmica do tecido ósseo, garantindo a sua capacidade de adaptação a diferentes solicitações mecânicas, contribuindo para a manutenção da saúde óssea e participando ativamente na regulação do equilíbrio mineral ósseo (Rubin & Lanyon, 1987).

2.2.2.4 Células de revestimento ósseo

As células que revestem o tecido ósseo, conhecidas como osteoblastos quiescentes, desempenham um papel na preservação da homeostase óssea, evitando a atividade excessiva dos osteoclastos quando não ocorre a remodelação óssea programada. Uma das suas funções primárias consiste na detecção de desequilíbrios nas forças mecânicas ou na matriz óssea. Estas células têm a capacidade de transformar-se em osteoblastos ativos em resposta a estímulos, como lesões ou aumento de solicitações mecânicas. Essa transição é de importância crítica para a manutenção da homeostase óssea, permitindo que o osso se adapte às necessidades do organismo e se repare após lesões. Portanto, as células de revestimento ósseo são componentes vitais no sistema regulatório da saúde óssea, garantindo a integridade e a funcionalidade do tecido ósseo ao longo do tempo.

2.3 Remodelação óssea

A remodelação óssea é um processo fundamental que ocorre periodicamente, aproximadamente a cada 10 anos, no organismo adulto (Manolagas, 2000). Esta desempenha diversas funções, incluindo (Eriksen (1986); Marie & Kassem (2011)):

Adaptação às Tensões Mecânicas: Os ossos ajustam-se às diversas forças e cargas a que são submetidos, preservando a integridade e resistência do tecido ósseo.

Reparação de Microtraumatismos e Fraturas: A remodelação óssea facilita a reparação de lesões e fraturas nos ossos, contribuindo para a manutenção e reparação do tecido ósseo.

Controlo da Homeostase Mineral: Este processo é fundamental para regular o equilíbrio de minerais, como cálcio e fósforo, no corpo, permitindo a rápida mobilização desses elementos quando necessário.

A fase inicial da remodelação óssea é a reabsorção, conduzida pelos osteoclastos, células especializadas, cuja função consiste em criar cavidades onde serão posteriormente formados os novos canais de *Volkman* e osteões. Após a reabsorção realizada pelos osteoclastos, os osteoblastos entram em ação. Estes migram para a área onde ocorreu a reabsorção e depositam novo tecido ósseo (Dempster (1997); Langdahl et al. (2016)). Durante esse processo, os osteoblastos secretam uma substância denominada de osteóide, que se mineraliza sob a ação dos osteócitos. Esse mecanismo é essencial para a formação dos novos osteões. Na Figura 2.4 encontra-se representado o processo de remodelação óssea.

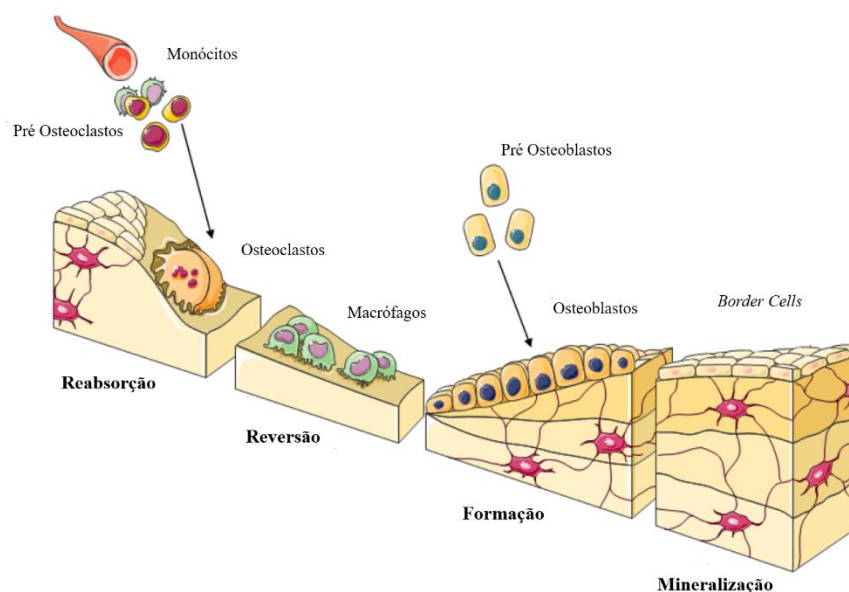


Figura 2.4 - Processo de remodelação óssea (adaptado de Servier medical art)

É crucial manter um equilíbrio entre reabsorção e deposição óssea para evitar condições patológicas, como a osteoporose, onde a densidade mineral óssea diminui significativamente (Langdahl et al., 2016).

É importante notar que, no caso de materiais implantados, é fundamental que ocorra uma remodelação óssea semelhante. As células ósseas devem estabelecer interações análogas com o material implantado, ou seja, serem decompostas quimicamente pelos osteoclastos e reconhecidas pelos osteoblastos, permitindo-lhes migrar e dar início ao processo de remodelação (Clarke, 2008).

2.4 Cicatrização óssea

A regeneração óssea é um processo complexo que ocorre em lesões ósseas de pequena escala, geralmente aquelas cujas dimensões são inferiores a duas vezes o diâmetro do osso afetado. Este processo é caracterizado por três fases distintas: a fase inicial inflamatória, a fase subsequente de reparação óssea e a fase final de remodelação óssea. Estas podem ser observadas através da Figura 2.5 (Fazzalari (2011); Marsell & Einhorn (2011); Sheen et al. (2023)).

Fase Inflamatória: A primeira fase da regeneração óssea é a fase inflamatória, desencadeada imediatamente após a lesão. Nesta etapa, ocorre uma resposta inflamatória localizada, resultando num hematoma devido à ruptura dos vasos sanguíneos que irrigam o osso e o periósteo, fornecendo uma estrutura temporária e uma base para o início do processo de reparação óssea. Citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento são libertados, atraindo células como leucócitos e macrófagos para o local da lesão. Essas células desempenham um papel na remoção de detritos celulares e na eliminação de microrganismos, preparando o local da lesão para a regeneração óssea posterior.

Fase de Reparação Óssea: Após a fase inflamatória, inicia-se a fase de reparação óssea. Os osteoblastos entram em ação, sintetizando novo tecido ósseo. Nesta etapa, pode ocorrer a formação de um calo fibrocartilagenoso, este proporciona uma base resiliente e flexível, especialmente importante em áreas sujeitas a movimentos e pressões articulares. De seguida, os osteoblastos continuam a produzir colagénio e proteínas não colagenadas, formando a matriz para o novo osso. Ocorre, então, a mineralização progressiva do novo tecido ósseo. Esse processo resulta na formação do calo ósseo, uma estrutura mais rígida que substitui o calo fibrocartilagenoso, proporcionando maior resistência mecânica.

Fase de Remodelação Óssea: A fase final do processo é a remodelação óssea. Nesta etapa, o tecido ósseo regenerado é otimizado para se adaptar às solicitações mecânicas e garantir a integridade óssea. O equilíbrio entre a reabsorção e deposição óssea é crucial para manter a densidade e a integridade adequadas do osso. Os osteoclastos desempenham um papel na reabsorção, enquanto osteoblastos continuam a sintetizar e fortalecer o osso. Este processo de remodelação contribui para a adaptação contínua do tecido ósseo às necessidades biomecânicas ao longo do tempo.

De salientar que a regeneração óssea é um processo altamente regulado e essencial para a manutenção da integridade do sistema esquelético após lesões ósseas. A compreensão das diferentes fases envolvidas nesse processo é crucial para o desenvolvimento de terapias e tratamentos que visem otimizar a regeneração e recuperação do tecido ósseo.

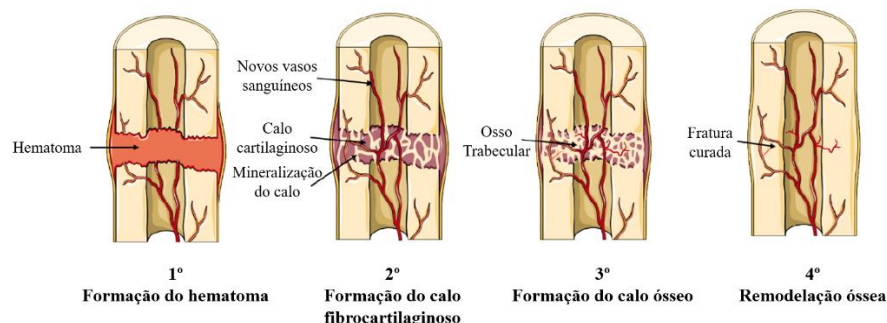


Figura 2.5 - Cicatrização óssea (adaptado de *Servier medical art*)

2.5 Defeitos ósseos

2.5.1 Considerações Iniciais

O tecido ósseo possui uma capacidade intrínseca de regeneração natural em casos de pequenas lesões, devido ao processo de remodelação óssea. No entanto, em situações de traumas severos ou patologias específicas, pode ocorrer uma perda substancial de tecido ósseo, o que compromete a eficácia da regeneração natural, resultando em defeitos ósseos críticos.

A definição precisa de um defeito ósseo crítico pode variar, mas geralmente implica dimensões da ordem de 10 a 20 mm ou uma perda de volume superior a 50% da circunferência do osso afetado. Existe controvérsia quanto à necessidade de intervenção cirúrgica em casos de

defeitos menores, com divergências notáveis em relação a defeitos com dimensões entre 6 e 12 mm. Defeitos que ultrapassam os 12 mm são comumente considerados críticos (Schemitsch (2017); Laurencin et al. (2006)).

Os defeitos ósseos críticos podem ser desencadeados por diversos fatores, como traumas, patologias específicas, anomalias congênitas ou procedimentos cirúrgicos para a remoção de tumores ósseos. Em tais circunstâncias, a perda de tecido ósseo pode prejudicar significativamente os processos de revascularização e diferenciação celular, culminando em fraturas ósseas espontâneas que requerem intervenção médica (Sela & Bab, 2012).

2.5.2 Situações de trauma

O tecido ósseo é notável pela sua elevada resistência e capacidade de resistir a cargas externas, embora o excesso dessas cargas possa culminar na ocorrência de fraturas. As fraturas frequentemente envolvem lesões nos tecidos moles adjacentes e podem ser desencadeadas por traumas intensos. O tratamento a ser adotado varia de acordo com a gravidade das fraturas, sendo que, em muitos casos, a imobilização mostra-se suficiente. No entanto, nos cenários de defeito ósseo crítico, a intervenção cirúrgica torna-se necessária (Bigham-Sadegh & Oryan, 2015).

Além do referido, as fraturas podem surgir devido à subcarga, provocada por tensão cíclica que pode levar à formação de microfraturas. A persistência dessa tensão pode ocasionar o desenvolvimento de um maior número de microfraturas até dar origem a uma fratura completa. O tratamento geralmente compreende repouso, imobilização e fisioterapia, sendo a intervenção cirúrgica uma ocorrência rara. As origens das fraturas podem variar, incluindo traumas e lesões decorrentes de sobrecarga (Astur et al., 2016).

2.5.3 Defeitos associados a um contexto fisiopatológico

Envelhecimento Populacional

O envelhecimento da população exerce um grande impacto na remodelação óssea, aumentando a suscetibilidade a doenças ósseas. A trajetória da massa óssea ao longo da vida pode ser dividida em três fases distintas: crescimento inicial, que se estende até os 20 - 30 anos de idade, seguindo-se por um período de estabilização e, por fim, uma fase de declínio da massa óssea (Clark et al., 2017).

O avanço da idade resulta na diminuição da atividade das células ósseas, o que, por sua vez, aumenta o risco de desenvolvimento de doenças ósseas, com a osteoporose emergindo como uma das mais proeminentes entre elas. Esta condição afeta predominantemente a população idosa e caracteriza-se pela diminuição da densidade e resistência óssea, aumentando assim a suscetibilidade a fraturas. Essas fraturas, frequentemente associadas à osteoporose, podem desencadear dor crônica e, sobretudo, resultados clínicos adversos em indivíduos idosos (Clark et al., 2017).

Cancro no Tecido Ósseo

O tecido ósseo pode ser afetado por tumores, que podem apresentar-se como benignos ou malignos, sendo classificados em duas categorias principais (Bădilă et al., 2021):

Tumores Primários: Estes tumores têm origem intrínseca no próprio tecido ósseo e são mais prevalentes em adolescentes e jovens adultos. Exemplos incluem o tumor osteoblástico e o osteoma osteoide.

Tumores Secundários (ou Metástases Ósseas): Tendem a ocorrer com maior frequência em indivíduos com mais de 50 anos e resultam da disseminação do cancro de outras origens para o tecido ósseo.

O tratamento desses tumores, de uma forma geral, envolve procedimentos cirúrgicos, frequentemente complementados por terapias adicionais, como quimioterapia ou radioterapia. A finalidade da cirurgia é realizar a ressecção do tecido ósseo, com a remoção do tumor, visando o tratamento e controlo da doença. No caso de tumores secundários, o foco do tratamento recai na gestão do cancro primário que metastizou para o tecido ósseo (Bădilă et al., 2021).

Infeções

Os defeitos ósseos podem ser decorrentes de infeções conhecidas como osteíte, que podem ter origem bacteriana, fúngica ou parasitária. Essas infeções podem manifestar-se em diversas circunstâncias, incluindo fraturas expostas, procedimentos cirúrgicos envolvendo osso, utilização de implantes de osteossíntese e disseminação a partir de infeções sanguíneas (Tiemann & Hofmann, 2009).

O tratamento inicial, de uma forma geral, envolve a administração de agentes antibacterianos ou antifúngicos. Contudo, em situações complexas, como aquelas que ocorrem após intervenções cirúrgicas, pode ser necessária a realização de procedimentos cirúrgicos para a remoção do tecido infetado, seguida de terapia antibiótica, visando a completa erradicação dos agentes patogénicos (Tiemann & Hofmann, 2009).

2.6 Soluções terapêuticas e estratégias de regeneração

2.6.1 Considerações iniciais

Em cenários que envolvem perda óssea substancial, decorrente de traumas graves ou patologias, é prática comum a utilização de biomateriais como substitutos ósseos. Esses materiais, independentemente da sua origem natural ou sintética, são projetados com a finalidade de interagir de forma sinérgica com o organismo humano, visando facilitar a regeneração, tratamento, substituição ou reparação de áreas anatómicas específicas. A seleção criteriosa dos materiais e técnicas de fabrico utilizados, e a adoção de estratégias terapêuticas apropriadas desempenham um papel fundamental no processo da regeneração óssea (Khan et al. (2005); Roberts & Rosenbaum (2012)).

2.6.2 Enxertos Ósseos

No contexto da reparação óssea, a seleção criteriosa de materiais é essencial para garantir que a reparação se assemelhe ao osso original, mantendo a sua funcionalidade e integridade. É imperativo que a seleção de materiais leve em consideração, não apenas as características da lesão, mas também as propriedades do tecido circundante, assegurando, assim, a eficácia do processo de reparação óssea.

2.6.2.1 Autoenxerto

O autoenxerto é uma técnica que envolve a extração de tecido ósseo autólogo do paciente, frequentemente da crista ilíaca, ou menos frequentemente, da tíbia, para posterior implantação na área recetora. O osso autólogo contém conteúdo orgânico e celular vivo, promovendo o crescimento ósseo e a formação de tecido ósseo. Além disso, a sua alta biocompatibilidade contribui para a minimização de reações imunológicas adversas. Consequentemente, essa abordagem é amplamente reconhecida como o padrão-ouro na reparação de defeitos ósseos (Laurencin et al. (2006); Fesseha & Fesseha (2020)).

No entanto, é importante ressaltar que os autoenxertos apresentam algumas limitações. A quantidade de tecido ósseo autólogo disponível é limitada, e o procedimento de extração pode resultar em morbidade na área de recolha. Estes são, portanto, fatores que devem ser cuidadosamente ponderados no planeamento cirúrgico.

2.6.2.2 Aloenxerto

O aloenxerto é um procedimento de transplante que envolve a transferência de tecido de um doador humano para outro indivíduo da mesma espécie, sendo frequentemente utilizado em situações de perda óssea considerável ou no tratamento de pacientes idosos. Diferentemente do autoenxerto, o aloenxerto requer um doador para fornecer o tecido humano (Fesseha & Fesseha, 2020).

As vantagens inerentes à utilização de aloenxertos compreendem a capacidade de mitigar as complicações associadas à morbidade na região de recolha no doente, uma maior disponibilidade de fontes doadoras e a versatilidade em relação às diferentes formas e tipos de tecido disponíveis, incluindo tiras, pó e lascas ósseas, abrangendo tanto tecido esponjoso quanto cortical e córtico-esponjoso. Além disso, os aloenxertos podem ser submetidos a diversos processos de fabricação, tais como liofilização, liofilização desmineralizada, preservação em estado fresco ou congelado. Contudo, é importante destacar que estes apresentam algumas limitações, como risco de rejeição, disponibilidade e osteocondução aleatória dentro do enxerto (Carvalho et al., 2021).

2.6.2.3 Xenoenxerto

Os xenoenxertos representam procedimentos de transplante que envolvem o uso de tecidos de espécies diferentes entre o doador e o recetor, exemplificados pela utilização de enxertos bovinos em pacientes humanos. A similaridade na estrutura anatómica em relação ao osso humano, juntamente com propriedades biomecânicas comparáveis, confere aos xenoenxertos vantagens. Essas vantagens incluem a estimulação da orientação do crescimento ósseo e, em determinadas circunstâncias, a capacidade de promover a osteogénese. De salientar, que estes destacam-se pela baixa probabilidade de transmissão de doenças infecciosas e bacterianas, o que contribui para mitigar a dependência de recursos humanos como doadores. Contudo, estes apresentam algumas limitações, tais como o risco de rejeição pelo sistema imunológico do recetor e a limitação da disponibilidade do tecido adequado (Fesseha & Fesseha, 2020).

2.6.3 Materiais para manutenção e substituição de propriedades mecânicas

A regeneração de defeitos ósseos requer uma abordagem adaptativa que varia de acordo com as características, dimensões e localização específica do defeito em questão. Os substitutos ósseos devem ser adaptados para responder a diversas necessidades, incluindo a preservação das propriedades mecânicas do osso e o preenchimento de defeitos de maior extensão.

Este procedimento envolve a preservação e estabilização de estruturas ósseas fraturadas por meio da aplicação de dispositivos de fixação ortopédica, como placas, parafusos e hastes metálicas. Os materiais mais frequentemente utilizados para esses dispositivos são metais e ligas, devido à sua alta resistência mecânica e biocompatibilidade. De salientar que a utilização de polímeros é menos comum e está condicionada pelas características do tecido ósseo em questão e pelo método de intervenção cirúrgica desejada. Esta abordagem promove uma recuperação funcional mais precoce do paciente, assegurando que a cicatrização ocorra com os fragmentos ósseos alinhados e estabilizados adequadamente (Kim et al., 2020).

2.6.4 Materiais de enchimento

Em cenários que envolvem falhas ósseas extensas, é imperativo recorrer a materiais, tais como a matriz óssea desmineralizada (DBM) (matriz orgânica rica em proteínas, colagénio e outros componentes naturais do osso), o cimento ósseo e os fosfatos de cálcio [Ca-P], que possuam a capacidade de preencher integralmente essas falhas críticas no sistema esquelético. Esses materiais devem possuir propriedades, como a osteocondutividade, que orienta o crescimento do tecido ósseo, e a osteoindução, que promove a regeneração óssea. Além disso, devem atender a requisitos de propriedades mecânicas apropriadas e, simultaneamente, demonstrar a capacidade de serem gradualmente absorvidos pelo organismo ao longo do tempo.

No caso dos materiais que não preenchem integralmente esses critérios, é necessário introduzir adaptações visando garantir uma regeneração eficaz do tecido ósseo (Carlos et al., 2018).

2.6.5 Engenharia de Tecido Ósseo

A engenharia de tecido ósseo, definida por Langer & Vacanti (1993), é uma abordagem que combina os princípios das ciências da vida e engenharia para conceber substitutos biológicos que restabelecem, mantêm ou aprimoram a função dos tecidos. Essa estratégia surge como uma perspectiva promissora para a resolução de defeitos ósseos, especialmente em contextos que envolvem o preenchimento de perdas ósseas, a reparação de lacunas na fusão da coluna vertebral e a estabilização de fraturas vertebrais por compressão.

No âmbito da engenharia de tecido ósseo, identificam-se três parâmetros essenciais: a criação de estruturas biocompatíveis que replicam a matriz extracelular dos ossos naturais, a utilização de células com potencial osteogénico e a incorporação de componentes bioativos que sinalizam para atrair células e direcioná-las à diferenciação osteogénica (Dimitriou et al., 2011).

Os filmes desempenham um papel fundamental na regeneração de tecidos danificados e na formação de novo tecido ósseo. Estes revestimentos finos, frequentemente produzidos a partir de materiais biocompatíveis, são aplicados diretamente no local da lesão ou defeito ósseo, oferecendo diversas funcionalidades (Stevens et al. (2008); Henkel et al. (2013)):

Libertação Controlada de Fatores de Crescimento: Os filmes podem ser estruturados para possibilitar a libertação gradual de fatores de crescimento, como o BMP-2 (Proteína Morfogénica Óssea-2), desempenhando um papel fundamental na estimulação da formação de novo tecido ósseo.

Moldagem Personalizada: Os filmes podem ser personalizados em termos de configuração e formato, adaptando-se de forma precisa às áreas específicas de defeitos ósseos, otimizando a regeneração e facilitando a integração com o tecido ósseo circundante.

Proteção e Isolamento: Os filmes exercem uma função protetora ao isolar a área do defeito ósseo de influências externas, como infeções ou processos inflamatórios, criando um ambiente propício para o processo de regeneração óssea.

Materiais Biodegradáveis: Diversos filmes são produzidos a partir de materiais com capacidade de biodegradação, permitindo que se desintegram gradualmente ao longo do processo de regeneração tecidual, evitando a necessidade de remoção cirúrgica posterior.

Adesão ao Tecido: Alguns filmes são projetados para aderir de forma eficaz tanto ao osso quanto ao tecido circundante, assegurando a sua permanência no local e fornecendo o suporte necessário para a regeneração óssea.

Indução da Diferenciação Celular: Além do referido, os filmes podem ser modificados com biomateriais que favoreçam a diferenciação de células-tronco em osteoblastos, as células responsáveis pela produção de tecido ósseo, facilitando o processo de regeneração óssea.

Em suma, os filmes desempenham um papel de extrema importância na área da engenharia de tecido ósseo, fornecendo uma plataforma versátil e personalizada para a regeneração de tecidos em defeitos ósseos, contribuindo significativamente para a recuperação e restauração da função do tecido ósseo afetado.

2.6.6 Métodos de fabrico

As diversas técnicas têm sido desenvolvidas com o propósito de produzir estruturas de suporte para o processo de regeneração de tecidos ósseos. A seleção apropriada das técnicas a utilizar é condicionada pelos materiais escolhidos e pelas características desejadas nos filmes resultantes. Neste contexto, torna-se relevante o estabelecimento de uma distinção entre metodologias convencionais e avançadas.

Técnicas Convencionais

Vazamento em molde (*Solvent casting*): Esta técnica implica o vazamento de uma solução filmogénica num molde plano. À medida que o solvente evapora, os elementos constituintes do filme organizam-se, dando origem a uma estrutura sólida. Esta abordagem é amplamente adotada devido à sua simplicidade e ao controlo relativo da espessura do filme resultante. O filme requer normalmente uma fase de cura, passando a ser insolúvel em água e aumentando as suas propriedades mecânicas (Stevens et al., 2008).

Técnicas de Imersão: Estas técnicas envolvem a imersão de substratos em soluções que contêm os componentes do filme. Camadas sucessivas são depositadas à medida que o substrato é imerso e retirado, permitindo, assim, o desenvolvimento de filmes multicamada com controlo sobre a composição de cada estrato (Stevens et al., 2008).

Técnicas Avançadas

Eletrofiação (*Electrospinning*): A eletrofiação consiste na criação de filmes compostos por nanofibras. Uma solução precursora é extrudida de modo eletrostático, originando nanofibras que são depositadas num substrato. Estas nanofibras apresentam uma elevada relação entre a superfície e o volume, tornando-as ideais para aplicações na engenharia de tecido ósseo (Kim et al., 2005).

Deposição de Camada por Camada (*Layer-by-Layer*): A deposição de camada por camada envolve a construção de filmes multicamada controlados. Camadas sucessivas de soluções que contêm polímeros ou componentes específicos são depositadas de forma alternada, proporcionando um controlo preciso sobre a espessura e a composição de cada camada (Caridade & Mano, 2017).

Métodos de cura de filmes para regeneração óssea

Para além de uma seleção criteriosa do método de fabrico dos filmes, é igualmente importante realizar uma seleção apropriada do método de cura, visando otimizar o desempenho

do filme na regeneração de tecidos ósseos comprometidos. Diversas abordagens são frequentemente utilizadas, entre as quais (Caridade & Mano, 2017):

Cura por Imersão: Este procedimento envolve a imersão dos filmes em soluções específicas, sendo o cloreto de cálcio uma escolha recorrente. A interação entre o filme e a solução propicia a gelificação, contribuindo para a formação de uma estrutura sólida.

Cura Térmica: A aplicação controlada de calor é utilizada para induzir a cura, especialmente em filmes que incorporam polímeros termoplásticos. O processo térmico visa solidificar o filme e ajustar as suas propriedades conforme necessário para a aplicação biomédica.

Cura por Radiação: A exposição a fontes de radiação, como luz ultravioleta (UV) ou feixes de elétrons, é utilizada para desencadear reações químicas específicas que solidificam o filme. Este método é particularmente eficaz para polímeros que respondem à polimerização por radiação.

Cura por Humidade: Dependendo da composição do filme, a exposição controlada à humidade ambiente pode ser utilizada para induzir a cura. Este método é aplicado em filmes que contenham materiais sensíveis à humidade, contribuindo para a formação de uma matriz estável.

Cura Química: A adição de reagentes químicos específicos desencadeia reações, como polimerização ou reticulação, resultando na solidificação do filme. Esta abordagem é relevante para ajustar as propriedades químicas do filme de acordo com os requisitos da aplicação em questão.

A escolha do método de cura é determinada pelas propriedades desejadas do filme, incluindo biocompatibilidade, estabilidade e capacidade de suportar a regeneração óssea. Cada abordagem possui vantagens e desvantagens, e a escolha adequada é essencial para garantir que os filmes cumpram os critérios da aplicação clínica em questão.

2.7 Biomateriais em regeneração óssea

2.7.1 Considerações iniciais

Diversos materiais são utilizados no processo de reparação do tecido ósseo, independentemente de sua origem, seja natural ou sintética. A seleção criteriosa desses materiais é essencial para atender às necessidades específicas da aplicação, tendo em consideração as propriedades anatômicas e biomecânicas do tecido ósseo alvo.

Na área da engenharia de tecido ósseo, inúmeros biomateriais têm sido minuciosamente investigados e aplicados com o propósito de promover a regeneração eficaz do tecido ósseo. Neste contexto, este trabalho centra-se numa análise aprofundada de três biomateriais: alginato, ι -carragenina e hidroxiapatite.

2.7.2 Alginato

O alginato é um polissacarídeo extraído de algas marinhas castanhas, sendo relevante devido à sua composição química, composta principalmente por ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico (Asti & Gioglio, 2014). Essa composição confere ao alginato a capacidade de formar géis quando exposto a íons de cálcio. Adicionalmente, o alginato destaca-se pela sua alta biocompatibilidade e baixa toxicidade. Devido à sua capacidade inata de formar géis à temperatura corporal, juntamente com a capacidade de permitir a libertação controlada de moléculas terapêuticas e fatores de crescimento, posiciona o alginato como um biomaterial promissor no desenvolvimento de matrizes destinadas à regeneração de tecido ósseo (Lee & Mooney, 2012).

2.7.3 ι -carragenina

A ι -carragenina, outro polissacarídeo, extraído de algas vermelhas, exibe uma estrutura química diversificada, composta por distintos tipos de carragenanas (ι -carragenina e μ -carragenina), cada qual apresentando propriedades reológicas e capacidades de gelificação específicas. As ι -carrageninas evidenciam biocompatibilidade e capacidade de estimular o crescimento de células ósseas, devido à presença de grupos sulfato que contribuem para aprimorar a adesão e proliferação celular. Manifestando potencial osteogénico, a ι -carragenina é utilizada em filmes compósitos para aprimorar a viabilidade celular. Além disso, a sua biocompatibilidade, torna-a um biomaterial versátil para a administração de fármacos. A ι -carragenina também apresenta propriedades biológicas benéficas, tais como anticoagulantes, antivirais, anticancerígenas e anti-inflamatórias (Cao et al., 2021).

Como resultado dessas características, estas têm sido extensivamente utilizadas como possíveis componentes de biomateriais para regeneração óssea, especialmente quando combinadas com outros biomateriais e fatores de crescimento.

2.7.4 Hidroxiapatite

A hidroxiapatite, um mineral composto por fosfato de cálcio, é naturalmente encontrada no esqueleto humano e apresenta uma composição química que se assemelha à estrutura mineral do tecido ósseo. Esta é extensivamente utilizada como substituto ósseo artificial, em virtude das suas propriedades biológicas, tais como biocompatibilidade, bioafinidade, bioatividade, osteocondução, osteointegração e osteoindução. Composta exclusivamente por íons de cálcio e fosfato, a HA demonstra ausência de toxicidade local ou sistémica adversa. Ao ser implantada, ocorre a conexão direta do osso recém-formado à HA através de uma camada de apatite carbonatada deficiente em cálcio, estabelecendo a interface osso-filme (Ripamonti et al., 2012).

A superfície da HA favorece a adesão, crescimento e diferenciação de células osteoblásticas, propiciando a deposição progressiva de osso, mediante a substituição do osso vivo

adjacente. Adicionalmente, filmes constituídos com HA podem desempenhar a função de veículos de entrega para citocinas, incluindo as BMP. A interação da HA com tecidos biológicos assume um papel crucial na regeneração, sendo a HA reconhecida como bioativa, permitindo a formação de ligações químicas diretas com os ossos. A sua osteoindutividade e a sua biodegradação, iniciada por alterações nos fluidos biológicos circundantes e pela adsorção de biomoléculas, são atributos fundamentais (Habibovic et al. (2004); Kattimani et al. (2016)).

A cinética de biodegradação da HA está condicionada à relação HA/trifosfato de cálcio (TCP), sendo que uma maior proporção resulta numa menor degradação (Ripamonti et al. (2012); Kattimani et al. (2016)). Estas propriedades conferem à HA um carácter promissor na regeneração óssea, destacando a importância da compreensão das respostas *in vivo* do hospedeiro à HA para com vista a otimizar a sua aplicação na engenharia de tecidos ósseos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os materiais utilizados na síntese dos filmes consistiram em alginato de sódio (Tokyo Chemical Industry Co.); ι-carragenina (Tokyo Chemical Industry Co.); D-sorbitol, cuja massa molecular é de 182,17 (Sigma-Aldrich); hidroxiapatite, com uma massa molecular de 502,31, (Sigma-Aldrich) e cloreto de cálcio, com uma massa molecular de 147,01 (Riedel-de Haën).

3.2 Preparação dos filmes

Para análise da influência da composição e método de fabrico dos filmes, foi desenvolvido um total de 5 configurações e 15 composições diferentes, conforme descrito na Tabela 3.1. A influência da composição base, foi avaliada fazendo variar a composição dos filmes entre 75-25%, 50-50% e 25-75% em peso relativo de alginato e ι-carragenina. Em todos os filmes foi adicionado D-sorbitol, como plasticizante, em quantidade equivalente à massa dos materiais filmogénicos. O processo de cura foi realizado por imersão em solução de cloreto de cálcio, num C1L ou nos dois lados C2L do filme e a introdução de HA foi feita quer diretamente na solução filmogénica HA-C2L e HA-C1L, quer na solução de cura, por forma a que este se deposite apenas sobre o lado curado do filme C1L-HA.

3.2.1 Procedimento experimental

Inicialmente, utilizando uma balança analítica de alta precisão (A&D, GR-200), os reagentes foram pesados de acordo com as quantidades da Tabela 3.1.

Para a preparação das soluções dos filmes (C2L, C1L, C1L-HA), o alginato de sódio, ι-carragenina, D-sorbitol e hidroxiapatite (apenas nos filmes HA-C1L, HA-C2L) foram adicionados a 100 mL de água destilada a 60 °C. As misturas foram homogeneizadas por agitação magnética durante 60 minutos a 2.000 rotações por minuto (rpm). Após a conclusão desse processo, as soluções foram transferidas para placas de Petri de plástico com um diâmetro de 14 cm e mantidas numa estufa (BINDER, ED 23) a 50 °C por 48 horas. Na Figura 3.1 encontra-se representado o processo de fabrico dos filmes.

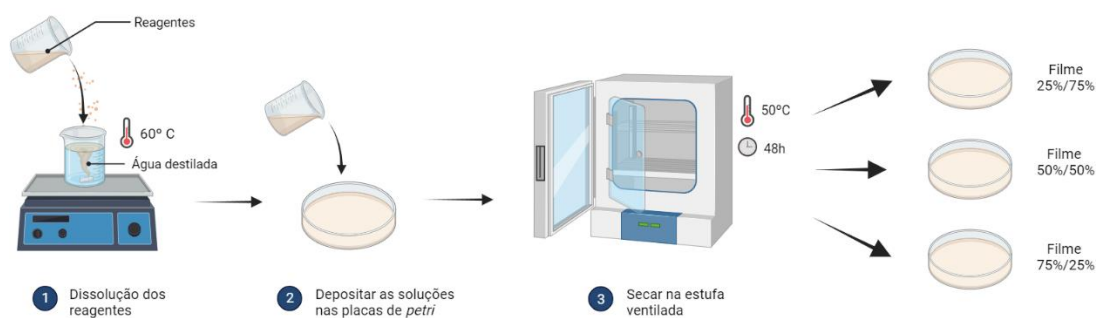


Figura 3.1 - Processo de fabrico dos filmes

Tabela 3.1 - Composição dos filmes (Sem HA (C2L, C1L), Com HA (HA-C2L, HA-C1L) e C1L-HA)

Filmes	Reagentes							
	Alginato de Sódio		ι-carragenina		D-Sorbitol		Hidroxiapatite	
	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]
Sem HA	75-25-C2L	0,75	37,50	0,25	12,50	1,00	50,00	-
	50-50-C2L	0,50	25,00	0,50	25,00	1,00	50,00	-
	25-75-C2L	0,250	12,50	0,75	37,50	1,00	50,00	-
	75-25-C1L	0,75	37,50	0,25	12,50	1,00	50,00	-
	50-50-C1L	0,50	25,00	0,50	25,00	1,00	50,00	-
	25-75-C1L	0,250	12,50	0,75	37,50	1,00	50,00	-
Com HA	75-25-HA-C2L	0,75	35,70	0,25	11,90	1,00	47,60	0,10 4,80
	50-50-HA-C2L	0,50	11,90	0,50	35,70	1,00	47,60	0,10 4,80
	25-75-HA-C2L	0,25	11,90	0,75	35,7	1,00	47,60	0,10 4,80
	75-25-HA-C1L	0,75	37,50	0,25	12,50	1,00	50,00	0,10 4,80
	50-50- HA-C1L	0,50	25,00	0,50	25,00	1,00	50,00	0,10 4,80
	25-75- HA-C1L	0,250	12,50	0,75	37,50	1,00	50,00	0,10 4,80
Cura com HA	75-25-C1L-HA	0,75	37,50	0,25	12,50	1,00	50,00	-
	50-50-C1L-HA	0,50	25,00	0,50	25,00	1,00	50,00	-
	25-75-C1L-HA	0,250	12,50	0,75	37,50	1,00	50,00	-

Neste estudo, foram realizados três métodos de cura com o propósito de avaliar os impactos das diferentes abordagens sobre as propriedades dos filmes. O processo de cura envolveu a preparação de duas soluções distintas:

Solução 1: 5% de cloreto de cálcio + H₂O

Solução 2: 5% de cloreto de cálcio + 1% HA + H₂O

Os métodos de cura utilizados consistiram em:

Cura 1 lado (C1L): A solução 1 foi aplicada apenas sobre uma das faces do filme por um período de 60 minutos, após o qual a solução foi removida e o filme foi colocado para secar ao ar livre.

Cura 2 lados (C2L): A solução 1 foi aplicada em ambas as faces do filme, mantendo-a em contacto com a solução por 2 minutos. Em seguida, a solução foi retirada e o filme foi colocado para secar ao ar livre.

Cura com HA (C1L-HA): A solução 2 foi aplicada apenas sobre uma das faces dos filmes (C1L-HA) por 60 minutos. Após esse período, a solução foi removida e o filme foi deixado para secar ao ar livre.

Os processos de cura mencionados, podem ser observados na Figura 3.2.

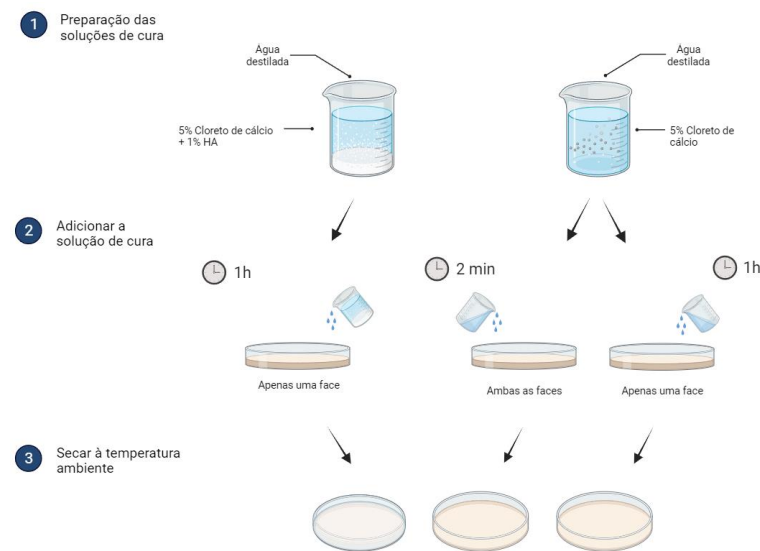


Figura 3.2 - Processo de cura dos filmes

3.3 Caracterização morfológica e físico-química dos filmes

3.3.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM) é uma técnica de observação da microestrutura de materiais. As análises por SEM foram conduzidas utilizando um microscópio eletrônico de varrimento (Hitachi S2400).

As amostras dos filmes compósitos foram preparadas de acordo com as práticas padrão, sendo revestidas com uma fina camada de liga de ouro e paládio para evitar a acumulação de carga elétrica durante a observação.

As imagens foram adquiridas sob vácuo a uma aceleração de 20 kV e uma distância de trabalho de 16. A ampliação utilizada nas análises variou de 100x a 10000x.

3.3.2 Ensaios reológicos

Os ensaios reológicos têm como objetivo medir a resistência de um fluido, que pode ser um líquido ou um gel, ao fluxo (viscosidade). Para a realização destes ensaios foi utilizado um

reómetro (MCR 92, Anton Paar), com sistema de medição CP50-1, adaptado para medições de viscosidade em materiais viscosos e não-newtonianos.

As amostras das soluções filmogénicas foram preparadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente. A temperatura de ensaio foi controlada a 60 °C, garantindo condições consistentes com o vazamento e secagem dos filmes. Antes dos ensaios, o equipamento foi devidamente calibrado de acordo com as instruções do fabricante para assegurar resultados precisos.

A curva reológica foi obtida com a medição de 50 pontos entre a taxa de corte de 1 a 1000 1/s, como explicado por Oun & Rhim (2017).

3.3.3 Ensaio de tração

Os ensaios de tração foram utilizados para determinar o comportamento mecânico dos filmes. Foi utilizada uma máquina de ensaios de tração universal (INSTRON 5544), com uma capacidade máxima de 250 N. Para garantir uma melhor resolução, foi utilizada uma célula de carga de 100 N. As amostras dos filmes foram cuidadosamente cortadas em forma de provetes tipo “osso de cão”, com dimensões da zona de medição 15 mm x 39 mm.

Em seguida, as amostras foram devidamente fixadas na máquina de ensaios de acordo com as especificações do equipamento. A velocidade de aplicação da carga foi mantida constante a 1 mm/min, e as medições foram registadas até que a amostra atingisse o ponto de fratura, permitindo a avaliação das propriedades de tração do material.

Para o cálculo da tensão no material foi medida a espessura dos filmes utilizando um micrómetro analógico de alta precisão (NewBrand, NB-MICR2). O micrómetro apresenta uma gama de medição que abrange de 0 a 25 mm, com uma precisão de medição de 0,01 mm. Cada filme foi posicionado sob a haste do micrómetro, e a medição da espessura foi realizada em cinco pontos diferentes do filme para garantir uma análise representativa.

As medições foram conduzidas em condições de temperatura ambiente. O gráfico tensão-extensão foi utilizado para a determinação do módulo de *Young* (utilizando o declive da zona linear elástica), da tensão de cedência, da tensão de carga máxima e da extensão de fratura dos filmes.

3.3.4 Molhabilidade por ângulo de contacto

A molhabilidade por ângulo de contacto é um ensaio que permite avaliar como um líquido interage com a superfície do filme. Os ensaios de ângulo de contacto foram realizados utilizando um goniómetro de ângulo de contacto (OCA 15EC, DataPhysics Instruments), em condições de temperatura ambiente.

Para obter o ângulo de contacto, gotas de água destilada com um volume de 3 µL foram depositadas sobre a superfície dos filmes. Em seguida, uma câmara digital, acoplada ao

equipamento, capturou imagens das gotas em tempo real. Os ângulos de contacto médio foram automaticamente calculados pelo *software* dpiMAX, que estava instalado num computador conectado ao equipamento. Foi realizado um total de cinco medições em diferentes pontos da superfície dos filmes, para o cálculo do ângulo médio.

3.3.5 Testes de absorção

Os testes de absorção de água (*swelling*) são utilizados para avaliar a capacidade de o material absorver líquidos e expandir. Os procedimentos para esses testes foram os seguintes:

Inicialmente, as amostras completamente secas ($n=3$), cada uma com dimensões de 10 mm x 10 mm, foram pesadas utilizando uma balança analítica de alta precisão. Em seguida, as amostras foram imersas em água destilada à temperatura ambiente, que foi mantida a 25 ± 0.5 °C. O tempo de imersão foi mantido constante, sendo de 5 minutos para todas as amostras. Após o período de imersão de 5 minutos, as amostras foram retiradas da água e qualquer excesso de líquido foi cuidadosamente absorvido com papel absorvente. Este procedimento foi realizado ao longo de 50 minutos.

A taxa de absorção de água (*swelling ratio*) dos filmes foi determinada utilizando a seguinte relação:

$$\text{Taxa de absorção [\%]} = \frac{P_1 - P_o}{P_o} * 100 \quad (3.1)$$

em que P_o é o peso inicial do filme e P_1 é o peso do filme após a imersão.

Desta forma foi possível calcular a variação percentual no peso das amostras após imersão durante um determinado intervalo de tempo, fornecendo uma medida quantitativa da capacidade de absorção de líquidos pelos materiais.

3.3.6 Teste de degradação

Os testes de degradação são fundamentais para avaliar a estabilidade e a durabilidade dos filmes compostos ao longo do tempo.

O método utilizado para avaliar a degradação do filme foi o de degradação *in vitro*, conforme descrito por Pereira et al. (2013). Inicialmente, as amostras secas com dimensões 24 mm x 24 mm foram pesadas com recurso de uma balança analítica de alta precisão. As amostras foram imersas numa solução salina tamponada com fosfato (PBS) com pH 7,4. As amostras foram armazenadas a 37 °C por um período de 30 dias, com a troca do meio de digestão a cada 5 dias.

Para analisar a influência do tempo na degradação dos filmes, as amostras foram recolhidas nos dias 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30. Cada amostra foi retirada da solução de degradação, submetida a uma lavagem com água destilada para remoção de impurezas, seguida da eliminação do excesso de água através de papel absorvente. Posteriormente, para determinar a perda de peso,

os filmes foram secos a 37 °C até atingirem um peso constante. O grau de degradação dos filmes, expresso como perda de peso, foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Perda de peso [\%]} = \frac{P_o - P_1}{P_o} * 100 \quad (3.2)$$

em que P_o é o peso inicial do filme e P_1 é o peso do filme após a imersão e secagem.

3.4 Testes *in-vitro*

3.4.1 Cultura de células

Na cultura celular realizada nos filmes produzidos, utilizou-se a linha celular não tumoral mamária MCF-10, adquirida através da *American type culture collection* (ATCC).

Para iniciar a cultura de células, uma placa de cultura de seis poços foi preparada, na qual foram inseridos cinco filmes distintos, nomeadamente 75-25-C1L, 75-25-C2L, 75-25-HA-C1L, 75-25-HA-C2L, e 75-25-C1L-HA. Adicionalmente, no último poço, uma lâmina de vidro foi colocada como controlo. Todas as amostras possuíam dimensões de 24 mm x 24 mm.

Após a execução do procedimento anteriormente referido, uma solução de 12 mL de meio Eagle Modificado por Dulbecco: Mistura de Nutrientes F-12 Ham (DMEM/Ham's F-12) (Sigma-Aldrich) foi preparada, suplementada com 5% de soro de cavalo, 1% de penicilina estreptomicina (Penstren), 0,05% hidrocortisona, 1% de fator de crescimento epidérmico (EGF), 1% de insulina e 10% de toxina colérica. Subsequentemente, cada poço foi plaqueado com 2 mL da solução referida, contendo 300.000 células.

Finalmente, a placa foi colocada numa incubadora padrão (BINDER, BD-S 115), mantida a uma temperatura de 37 °C, numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂, durante 48 horas e 96 horas. Este processo encontra-se ilustrado na Figura 3.3.

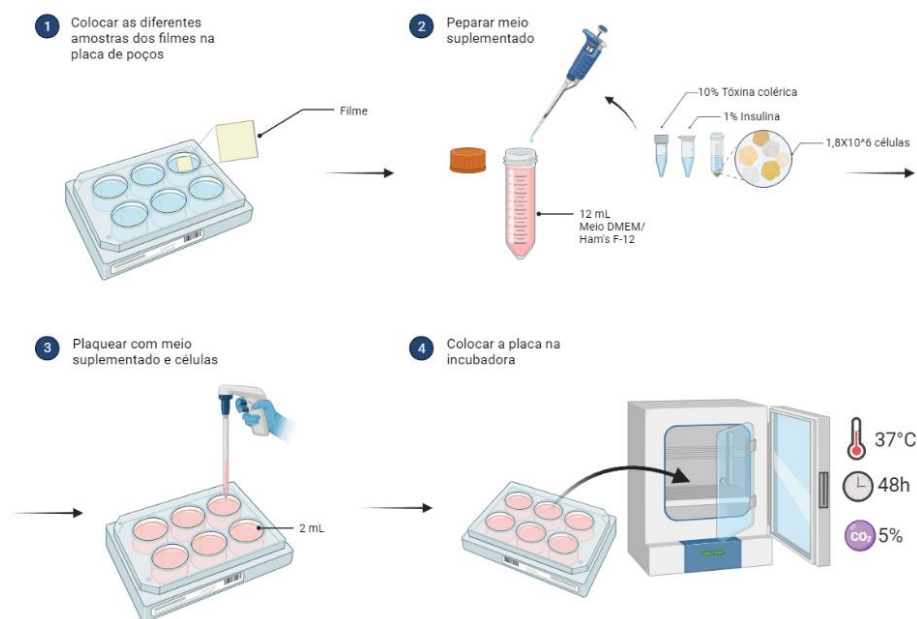


Figura 3.3 - Processo de cultura celular

Posteriormente, procedeu-se à avaliação da superfície das amostras utilizando um microscópio de fase invertida (Zeiss, Axiovert 40 C) com uma objetiva de ampliação 5x, associada a uma lente ocular de 10x, resultando numa ampliação total de 50x. Foram capturadas imagens nos seguintes intervalos temporais: 24, 48, 72 e 96 horas.

Todos os fatores de crescimento utilizados nas culturas celulares foram adquiridos através Sigma-Aldrich. As placas de poços de cultura de tecidos (CT) foram adquiridas pela Orange Scientific. Os frascos de CT foram adquiridos pela Sarstedt Ag&Co.

3.4.2 Viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular, recorreu-se à utilização de uma máquina automatizada de contagem celular denominada "*Cell Count*" (Thermo Fisher Scientific, Countess 3 FL). Este dispositivo integra uma combinação de fontes luminosas e fluorescência com o propósito de identificar e quantificar células. A luz é utilizada para iluminar as células, ao passo que a fluorescência revela a presença dos corantes em células não viáveis. Com base nas propriedades fluorescentes, a máquina realiza uma classificação automática entre células viáveis e não viáveis, proporcionando uma contagem precisa.

Posteriormente, procedeu-se à extração das células dos distintos filmes presentes na placa de poços. Inicialmente, o meio de cultura foi descartado. Em seguida, adicionou-se 300 µL de tripsina em cada poço, seguido por uma incubação a 37 °C numa atmosfera contendo 5% de CO₂, por um período de 5 minutos. A tripsina, uma enzima proteolítica, foi utilizada para dissociar células aderentes do substrato. Após a desagregação celular, a neutralização da tripsina ocorreu mediante a adição de 750 µL de meio em cada poço. O conteúdo de cada poço foi aspirado, transferido individualmente para tubos de centrifugação e centrifugado a 1.000 rpm por 5 minutos numa centrífuga (eppendorf, centrifuge 5702 R).

Após a conclusão da etapa precedente, o sobrenadante foi descartado, resultando na preservação do *pellet* de células. Adicionalmente, 1.000 µL de meio de cultura foram adicionados a cada tubo para homogeneizar a suspensão celular. Finalmente, 10 µL de cada suspensão celular foram retirados, transferidos para tubos de *eppendorf* e misturados com 10 µL de corante azul de tripiano. Estas soluções foram então distribuídas em lâminas de contagem devidamente identificadas, onde posteriormente foi conduzida a contagem através da máquina de contagem celular.

3.4.3 Proliferação celular

Com o propósito de investigar a proliferação celular nos filmes, adotou-se a técnica de coloração utilizando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Esta metodologia permite a marcação de ácido desoxirribonucleico (DNA), consequentemente evidenciando os núcleos. Tal abordagem

torna possível a análise qualitativa dos núcleos e sua morfologia em diferentes subpopulações celulares, além da avaliação da sua distribuição espacial ao longo dos filmes.

Inicialmente, procedeu-se à preparação das células para a condução do ensaio. O meio de cultura DMEM/Ham's F-12 foi removido dos poços onde as células foram crescidas nos diferentes filmes durante 2 dias. Posteriormente, as células foram fixadas com uma solução de 4% formaldeído (Thermo Scientific) em PBS, onde se adicionou 1 mL desta solução a cada poço, mantendo por um período de 15 minutos à temperatura ambiente. Após este intervalo, a solução de formaldeído foi removida e substituída por 1 mL de PBS em cada poço. Em seguida, procedeu-se à adição da solução de DAPI diluída (1 µg/mL em PBS) às células, incubando por 5 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Após essa etapa, as amostras foram lavadas com PBS para remover o excesso de DAPI não ligado. Subsequentemente, as lâminas foram montadas utilizando um meio de montagem *antifading* para microscopia de fluorescência. Finalmente, as células foram observadas com recurso a um microscópio confocal (ZEISS, LSM 980). O DAPI foi observado expondo as amostras a um comprimento de onda de 405 nm.

3.5 Análise estatística

As diferentes amostras (n=3.5) utilizadas na caracterização morfológica e determinação das diferentes propriedades dos filmes, foram analisadas de forma a determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre si. Dada o reduzido número de amostras produzidas, foi utilizado o teste de significância ANOVA em conjunto com o teste não paramétrico de Bonferroni, para determinar a existência de diferenças significativas quando $p < 0.05$.

4 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS

4.1 Caracterização dos filmes

4.1.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A análise da morfologia superficial dos filmes foi conduzida por meio de microscopia eletrônica de varrimento. Foram obtidas imagens de quatro filmes distintos: Sem HA (C1L, C2L); e Com HA (HA-C2L, C1L-HA), cada um apresentando uma composição relativa de alginato e ι-carragenina, 75%/25%, 50%/50%, e 25%/75%, respectivamente.

A utilização de duas ampliações distintas, nomeadamente 200x (baixa ampliação) e 2000x (alta ampliação), foi adotada com o propósito de realizar uma análise abrangente da morfologia dos filmes em diferentes escalas de observação. A ampliação de 200x possibilita uma visualização panorâmica, enquanto a ampliação de 2000x viabiliza a identificação detalhada de características microscópicas. Na Figura 4.1 é possível observar imagens SEM dos diferentes filmes com ampliação 200x.

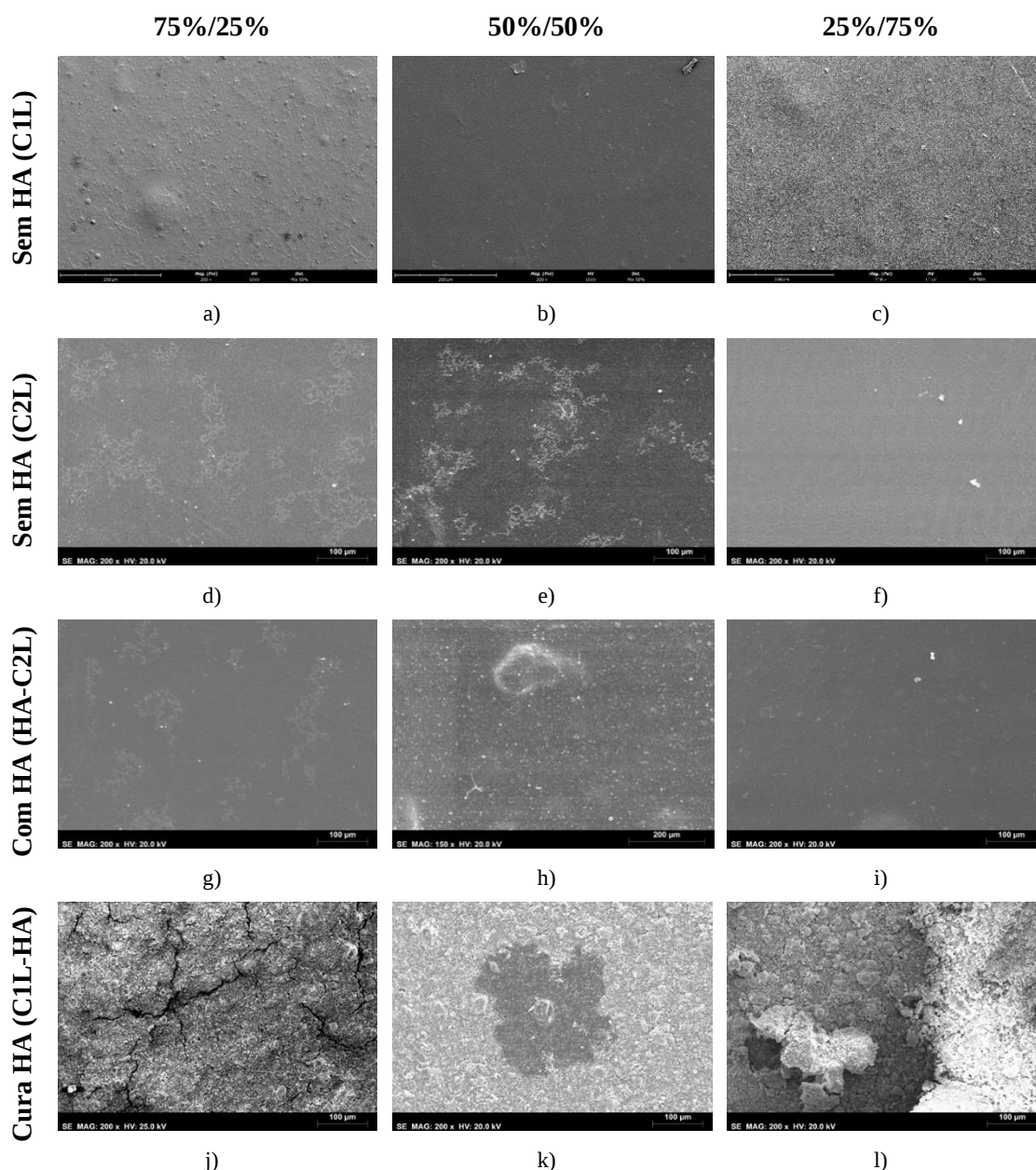


Figura 4.1 - Microscopia eletrônica de varrimento da superfície dos filmes, com ampliação 200x, a) 75-25-C1L, b) 50-50-C1L, c) 25-75-C1L, d) 75-25-C2L, e) 50-50-C2L, f) 25-75-C2L, g) 75-25-HA-C2L, h) 50-50-HA-C2L e i) 25-75-HA-C1L, j) 75-25-C1L-HA, k) 50-50-C1L-HA e l) 25-75-C1L-HA

Numa primeira análise das imagens obtidas com uma ampliação de 200x (Figura 4.1), nos casos dos filmes sem HA e com HA na solução filmogénica, não se observam diferenças visíveis quanto à sua superfície. Ambos exibiram superfícies homogêneas, com cores uniformes indicando uma mistura eficaz das fases (Figura 4.1 a), b), f) e i)). No entanto, na Figura 4.1 c), d), e), g) e h), observaram-se cores distintas, sugerindo a presença de duas fases que não se encontram completamente solubilizadas.

Nas imagens dos filmes C1L-HA (Figura 4.1 j), k) e l)), é possível identificar uma superfície rugosa, devido à deposição de HA na superfície do filme. Estas partículas são de grande dimensão (5 a 10 μm) pelo que, provavelmente, se pode afirmar que resultam do processo de

deposição e aglomeração sobre a superfície durante a fase de cura do filme. Na Figura 4.1 k) é possível verificar um contraste de cores, onde através de uma análise química foi possível identificar que a zona mais escura, correspondia a partículas de HA e polímeros (alginato e ι-carragenina), sugerindo uma zona mais uniforme, onde as partículas de hidroxiapatite se encontravam bastante bem ligadas aos polímeros, ao passo que na zona mais clara, correspondia a partículas de HA, sugerindo uma superfície mais rugosa onde se encontravam depositadas partículas de HA sem revestimento polimérico.

Destaca-se que não foram observadas diferenças significativas quanto à morfologia do filme para as suas diferentes composições base.

Na Figura 4.2 abaixo apresentada, é possível observar imagens SEM dos diferentes filmes com ampliação 2000x.

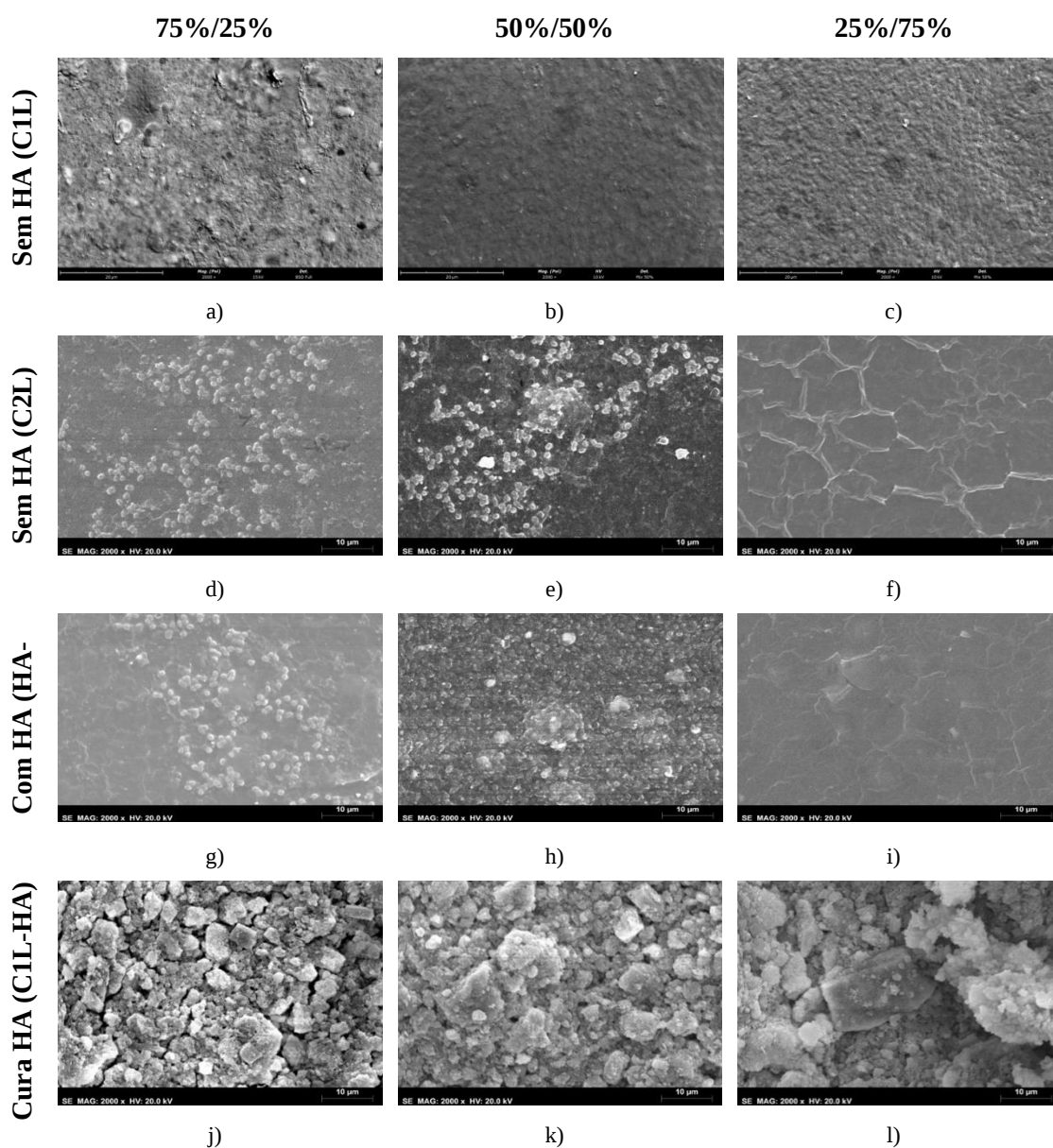


Figura 4.2 - Microscopia eletrônica de varrimento da superfície dos filmes, com ampliação 2000x, a) 75-25-C1L, b) 50-50-C1L, c) 25-75-C1L, d) 75-25-C2L, e) 50-50-C2L, f) 25-75-C2L, g) 75-25-HA-C2L, h) 50-50-HA-C2L e i) 25-75-HA-C1L, j) 75-25-C1L-HA, k) 50-50-C1L-HA e l) 25-75-C1L-HA

Nas imagens de alta ampliação (2000x) (Figura 4.2), foi possível analisar o tamanho e a geometria dos poros. Matrizes porosas facilitam uma melhor vascularização e, consequentemente, osteocondutividade, contribuindo para uma maior resistência da interface filme-osso (Sorg et al., 2022).

Na Figura 4.2 f), é possível observar várias segregações na superfície, através de uma análise química da área da interface entre a área mais clara e a mais escura. Foi possível identificar que a zona escura corresponde a uma zona rica em alginato, ao passo que a zona mais clara corresponde a uma zona rica em ι-carragenina. Sugere-se, através da uma análise das informações obtidas, que as segregações possam ter surgido devido ao aparecimento de microfissuras, resultantes de diferentes velocidades de secagem dos filmes. Através dessas microfissuras, possivelmente, a fase rica em ι-carragenina pode ter sido segregada, uma vez que seria mais fácil energeticamente, visto que a fissura já existia. O mesmo foi constatado na Figura 4.2 i), embora em menor quantidade. É possível concluir que os filmes Sem HA, com maiores quantidades de alginato na sua composição, apresentaram mais segregações na superfície.

Através da observação da Figura 4.2 (g), h), j) e k)), é possível verificar a presença de aglomerados de partículas brancas, a partir de uma análise química verificou-se que são aglomerados de alginato.

De uma forma geral, não são visíveis grandes discrepâncias na morfologia da superfície entre os filmes sem HA e com HA na solução filmogénica, ambos apresentam partículas semelhantes. Esta observação pode ser atribuída à baixa quantidade de HA, levando à sua dissolução juntamente com outros reagentes.

Relativamente aos filmes C1L-HA, é bastante visível a deposição de HA na superfície, exibindo partículas de dimensões consideravelmente superiores em comparação com os restantes filmes. Na Figura 4.2 l) foi realizada uma análise química onde se verificou a presença de cálcio, fósforo e oxigénio bem identificados, comprovando que são partículas de HA.

Na Figura 4.3, apresentada abaixo, é possível visualizar as imagens SEM, da secção transversal dos diferentes filmes, com ampliação 100x.

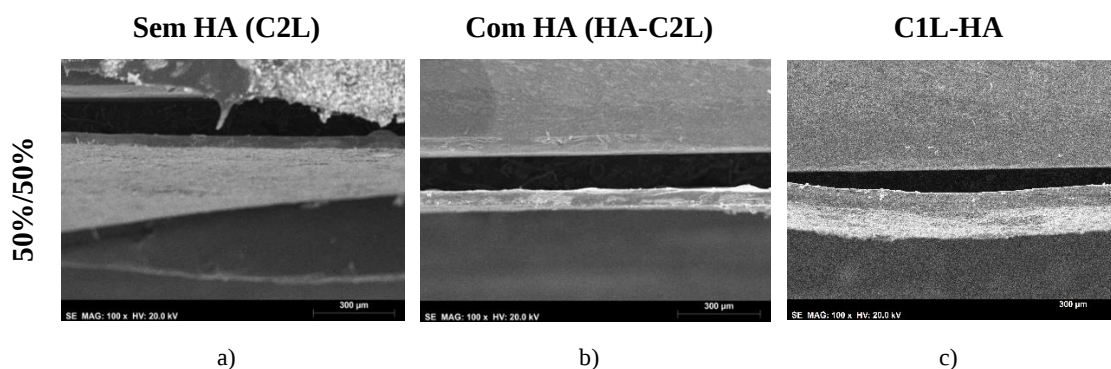


Figura 4.3 - Microscopia eletrónica de varrimento da secção transversal dos filmes, com ampliação 100x, a) 50-50-C2L, b) 50-50-HA-C2L, c) 50-50-C1L-HA

Através da observação das secções transversais dos filmes é possível constatar que, na imagem a), observa-se uma superfície homogênea de uma única fase, onde a espessura do filme permanece relativamente constante. Ao comparar com a superfície da imagem b), verifica-se um ligeiro relevo, possivelmente derivado da presença de HA. Por fim, na imagem c), é possível verificar a existência de duas fases distintas, onde uma delas corresponde aos polímeros e a outra corresponde a uma camada de deposição de HA na superfície, derivado do tipo de cura utilizado.

4.1.2 Ensaio reológico

Os ensaios realizados revelaram padrões distintos de viscosidade em função da taxa de corte aplicada. Os resultados dos ensaios realizados nas soluções Sem HA e Com HA, com concentrações relativas de alginato/*ι*-carragenina 75%/25%, 50%/50% e 75%/25%, encontram-se ilustrados no Figura 4.4.

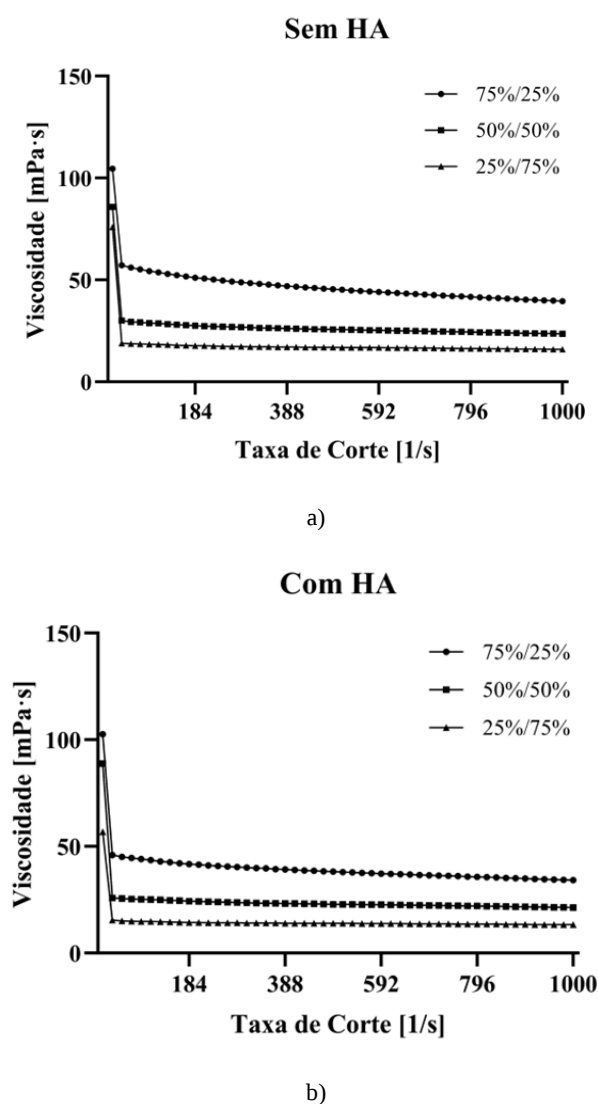


Figura 4.4 - Resultados dos ensaios de viscosidade das soluções a) Sem HA e b) Com HA, com concentrações relativas de alginato/*ι*-carragenina 75%/25%, 50%/50% e 75%/25%

Através da análise dos resultados obtidos nos ensaios, foi constatado que, em situações de baixa taxa de corte, as soluções apresentam uma viscosidade mais elevada, indicando uma resposta mais rígida e resistente ao fluxo. Por outro lado, em taxas de corte mais elevadas, a viscosidade decresceu, evidenciando uma maior capacidade de deformação e menor resistência ao fluxo. As soluções filmogénicas 75-25 e 50-50 (com e sem HA) mostram uma queda gradual da sua viscosidade, já a solução 25-75 apresenta uma viscosidade quase constante.

Na Figura 4.4 a) e b), observa-se que as concentrações de 75%/25% revelaram os valores mais altos de viscosidade (47 MPa·s na solução Sem HA e 40 MPa·s na solução Com HA) ($p < 0.05$), enquanto as concentrações de 25%/75% apresentaram os valores mais baixos (18 MPa·s na solução Sem HA e 15 MPa·s na solução Com HA) ($p > 0.05$). Assim, é possível inferir que a presença de concentrações superiores de alginato confere à solução uma maior viscosidade.

As soluções sem HA na sua composição revelaram, em todas as concentrações, valores superiores de viscosidade em comparação com as soluções que incluíam HA na sua composição. Mashahdi & Idris, 2021 obtiveram resultados semelhantes, atribuindo a redução da viscosidade a alterações na massa molecular da solução provocadas pela adição de HA.

Por último, destaca-se que a solução que evidenciou os melhores resultados reológicos foi a solução Sem HA 75%/25%. Soluções filmogénicas com elevada viscosidade podem proporcionar uma sustentação estrutural melhor, sendo benéfico para a manutenção da forma do filme por um período prolongado durante a secagem do mesmo. Adicionalmente, a viscosidade mais elevada pode contribuir para uma libertação sustentada de substâncias ativas incorporadas no filme, conferindo benefícios terapêuticos ao longo do tempo. Contudo se a solução filmogénica apresentar uma viscosidade demasiada elevada, pode induzir defeitos no filme ao não preencher totalmente o molde onde é vazada. Tal não se verificou durante este trabalho.

4.1.3 Ensaios de tração

No decorrer deste estudo, foram realizados ensaios de tração em amostras dos filmes produzidos. A análise dos resultados desses ensaios é fundamental para a compreensão da resposta mecânica desses materiais quando submetidos a cargas externas.

A curva característica de um ensaio de tração, conhecida como curva tensão-deformação, ilustra o comportamento de um material sob carga de tração progressiva. Destacam-se as seguintes fases para uma melhor compreensão (Korhonen & Saarakkala, 2011):

Região Elástica (Linear): Nesta fase, o material deforma-se proporcionalmente à carga e retorna à sua forma original após a remoção da carga.

Limite Elástico e Tensão de Cedência: O limite elástico (LE) inicia-se quando ocorre um desvio da linearidade. A tensão de cedência corresponde ao ponto de deformação permanente após a remoção da carga.

Região Plástica: Nesta fase, ocorre deformação permanente sem aumento significativo da tensão aplicada.

Tensão de Carga Máxima: Representa a tensão máxima suportada pelo material antes da fratura.

Extensão de Fratura: Deformação total correspondente ao ponto de fratura do filme.

Ao analisar as curvas tensão-deformação resultantes dos ensaios de tração, sintetizou-se os valores obtidos na Tabela 4.1, onde foi possível observar o comportamento mecânico dos filmes produzidos.

Tabela 4.1 - Resultados dos ensaios de tração nos filmes produzidos, Tensão de Carga Máxima, Extensão de Fratura, Tensão de Cedência e Módulo de Young

Amostras		Tensão Máxima [MPa]	Extensão de Fratura [mm/mm]	Tensão de Cedência [MPa]	Módulo de Young [MPa]
Sem HA (C1L)	75%/25%	46 ± 0,00	0,07 ± 0,00	24 ± 0,00	2055 ± 0,00
	50%/50%	38 ± 8,16	0,17 ± 0,07	19 ± 1,00	1290 ± 55,73
	25%/75%	37 ± 7,39	0,10 ± 0,15	12 ± 1,50	641 ± 10,81
Sem HA (C2L)	75%/25%	66 ± 5,51	0,20 ± 0,00	38 ± 4,36	6794 ± 653,90
	50%/50%	41 ± 0,71	0,70 ± 0,05	23 ± 4,24	3250 ± 71,74
	25%/75%	26 ± 1,53	0,06 ± 0,05	11 ± 2,31	1436 ± 136,27
Com HA (HA-C1L)	75%/25%	50 ± 7,02	0,85 ± 0,03	29 ± 6,91	2683 ± 199,78
	50%/50%	42 ± 11,24	0,15 ± 0,05	20 ± 5,29	1457 ± 386,59
	25%/75%	20 ± 1,83	0,33 ± 0,04	5 ± 0,96	345 ± 75,53
Com HA (HA-C2L)	75%/25%	32 ± 0,71	0,29 ± 0,00	18 ± 3,53	2387 ± 455,31
	50%/50%	21 ± 3,54	0,38 ± 0,45	12 ± 2,83	1051 ± 146,49
	25%/75%	19 ± 2,75	0,09 ± 0,04	8 ± 1,71	738 ± 202,83
Cura HA (C1L-HA)	75%/25%	17 ± 5,57	0,12 ± 0,03	11 ± 3,61	827 ± 172,71
	50%/50%	11 ± 1,00	0,18 ± 0,13	5 ± 1,06	455 ± 219,61
	25%/75%	22 ± 6,36	0,03 ± 0,01	11 ± 2,83	1431 ± 297,90

Conforme abordado na revisão bibliográfica, os filmes desempenham uma função essencial como estruturas de suporte que orientam os processos de migração, proliferação e diferenciação celular. Para além de servirem como substitutos eficazes da matriz extracelular, é necessário que os filmes apresentem características específicas, incluindo elevada porosidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e comportamento mecânico equiparável ao tecido ósseo (Henkel et al., 2013). Os filmes devem apresentar rigidez e a resistência adequadas para sustentar

os processos de cultura celular *in vitro*, uma vez que as células estão sujeitas a alterações morfológicas que podem resultar em forças de tração (Dimitriou et al., 2011).

Ao analisar os dados provenientes dos ensaios de tração, verifica-se que a variação na composição dos filmes influenciou as propriedades mecânicas, especialmente nos filmes Sem HA (Tabela 4.1). Verifica-se que os filmes com maior quantidade de alginato na composição (75-25) apresentam módulos de elasticidade, tensões de cedência e de carga máxima mais elevados. O valor do módulo de *Young* mais elevado obtido foi de 6794 MPa para o filme 75-25-C2L, um aumento de 79% quando comparado com o filme 25-75-C2L (menor percentagem de alginato), esta diferença é estatisticamente significativa com um valor de $p < 0.001$. Resultados semelhantes foram obtidos para a tensão de cedência, que atingiu 38 MPa no filme 75-25-C2L e na tensão de carga máxima (66 MPa). Essa melhoria pode ser atribuída à estrutura molecular do alginato, que contribui para a formação de filmes mais coesos e resistentes. Os grupos carboxilatos nas cadeias do alginato favorecem interações específicas, como pontes de hidrogénio, contribuindo para a coesão molecular (Paşcalau et al., 2012).

O processo de cura tem também uma influência importante nas propriedades mecânicas dos filmes sem HA. Assim o filme 75-25-C1L vê a sua rigidez diminuir para 2055 MPa, uma redução de 70% quando comparado com o filme 75-25-C2L. Também a tensão de cedência e a tensão de carga máxima dos filmes C1L foram afetadas, reduzindo-se o seu valor máximo para 24 MPa e 46 MPa, respetivamente. Este resultado é esperado, pois com a cura em apenas uma face o filme fica menos rígido e resistente aos esforços aplicados. Seria de esperar uma evolução oposta no que diz respeito à extensão de fratura, mas tal não se verificou. Este facto deve-se à fragilidade dos filmes, o que resulta na sua fratura fora da zona útil da amostra.

A adição de HA na composição dos filmes, apresentou dois comportamentos distintos, um de melhoria das propriedades mecânicas (C1L) e outro de diminuição das mesmas (C2L). As melhorias verificadas no filme 75-25-HA-C1L comparativamente com o filme base 75-25-C1L foi um aumento da tensão máxima de 8%, tensão de cedência de 17% e um aumento do módulo de *Young* de 24%. Contudo no filme 75-25-HA-C2L, essa incorporação resultou numa diminuição de 52% na tensão máxima, 53% na tensão de cedência e 65% no módulo de *Young*. A presença de HA pode ter introduzido variações na estrutura do filme, demonstrando um comportamento mais frágil durante o ensaio, possivelmente pela dureza das partículas de hidroxiapatite.

Além disso, o tipo de cura também influenciou significativamente as propriedades mecânicas dos filmes. A C1L demonstrou resultados superiores em comparação com a C2L (menor percentagem de alginato), apresentando um aumento da tensão máxima de 36%, tensão de cedência de 38% e um aumento de 11% do módulo de *Young*. No entanto, no filme C1L-HA, a adição de HA na superfície resultou numa diminuição das propriedades mecânicas, apresentando valores mais baixos de tensão máxima (17 MPa), tensão de cedência (11 MPa) e

módulo de *Young* (827 MPa). Em comparação com o filme 75-25-C1L, observou-se uma redução de 63% na tensão máxima, 54% na tensão de cedência e 60% no módulo de *Young*.

Ao avaliar as propriedades mecânicas em relação ao osso cortical, nomeadamente o módulo de *Young* (7–30 GPa), constata-se que o filme mais congruente com as características do osso foi o filme 75-25-C2L, exibindo um módulo de *Young* de 6794 MPa.

Em resumo, a composição de 75%/25% apresentou as melhores propriedades mecânicas. O tipo de cura que se demonstrou mais eficaz foi a cura em ambos os lados, nomeadamente nos filmes Sem HA ($p < 0.001$). Finalmente, a adição de HA teve um impacto negativo nas propriedades mecânicas dos filmes ($p < 0.001$).

Por forma a comparar os resultados obtidos com a literatura, analisou-se um estudo conduzido por Barbut & Harper (2019), no qual foram produzidos filmes contendo alginato de cálcio (5%) e κ -carragenina (0,0025%). Estes filmes foram produzidos utilizando glicerol, como agente plasticizante, e incorporando a solução de cura gota a gota na solução filmogénica. Posteriormente, os filmes foram condicionados a 57% e 100% de humidade relativa. Os filmes referidos apresentaram propriedades mecânicas inferiores comparativamente aos filmes Sem HA (C1L e C2L). Enquanto os filmes desse estudo exibiram um módulo de *Young* de 603 MPa e 172 MPa, os filmes Sem HA (C1L e C2L) demonstraram um módulo de elasticidade médio de 1329 MPa e 3827 MPa, respetivamente. Resultando num aumento médio de 85%. A diferença fundamental entre estudos foi o condicionamento do filme, pelo que se conclui que este leva a absorção de água o que reduz as suas propriedades mecânicas.

4.1.4 Molhabilidade por ângulo de contacto

Foram realizadas medições dos ângulos de contacto nos filmes Sem HA (C1L, C2L), Com HA (HA-C2L) e Cura com HA (C1L-HA) para avaliar o comportamento superficial dos filmes mencionados.

Os resultados, decorrentes da deposição controlada de gotículas de água sobre a superfície dos filmes, revelam os ângulos de contacto formados com o substrato. Esses valores são indicadores quantitativos da molhabilidade intrínseca das superfícies dos filmes, desempenhando um papel importante na compreensão da afinidade da superfície do filme com a água destilada. Esta propriedade ganha importância especial em ambientes clínicos, uma vez que é crucial para impedir que o filme se solte ou desloque do local de aplicação, conforme referido por Menzies's & Jones (2010).

A Figura 4.5 apresenta detalhadamente os resultados dos ângulos de contacto obtidos de cada configuração de filme.

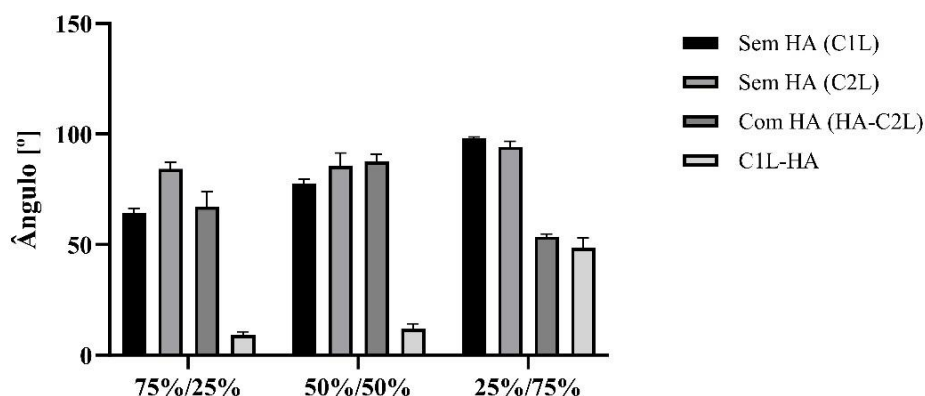


Figura 4.5 - Ângulos de contacto dos filmes Sem HA (C1L), Sem HA (C2L), Com HA (HA-C2L) e C1L-HA

Através da análise dos ângulos obtidos, é possível inferir que o tipo de cura desempenhou um papel relativo na molhabilidade dos filmes. O filme 75-25-C1L (submetido à cura em apenas um lado) apresenta um valor inferior do ângulo de contacto (65,5 °) em comparação com o filme 75-25-C2L (84,2 °) (curado em ambos os lados) ($p < 0.001$). Para os filmes 50-50-C1L e 25-75-C1L os ângulos de contacto variaram de 77,6 ° a 98,0 ° ($p < 0.001$), à medida que aumentou a concentração de ι-carragenina. Já nos filmes 50-50-C2L e 25-75-C2L os ângulos variaram entre 85,5 ° e 94,2 ° ($p > 0.05$), não se verificando diferenças significativas entre o método de cura. A diferença verificada nos filmes com maior percentagem de alginato pode ser atribuída à capacidade da cura em ambos os lados de promover uma adesão mais eficaz do material ao substrato, resultando numa superfície mais coesa e, potencialmente, menos suscetível à interação com a água.

Observou-se também que os filmes sem HA na sua composição (C2L) exibiram valores de ângulo de contacto semelhantes aos filmes com HA, apenas o filme 25-75-HA-C2L apresentou um ângulo de contacto inferior (53,6 °). Desta forma não foi possível retirar conclusões sobre a influência da presença de HA na composição do filme.

Em contraste, a presença de HA na solução de cura (filmes C1L-HA) conferiu maior hidrofiliabilidade às superfícies. O ângulo de contacto mais baixo obtido foi de 9,0 °, no filme 75-25-C1L-HA, o mesmo pode dever-se ao facto da gota ser praticamente absorvida de imediato pelo filme, em particular pela camada de HA que se depositou sobre o filme durante o processo de cura.

No geral verifica-se que a composição base dos filmes influencia a hidrofiliabilidade dos mesmos, existindo uma correlação positiva entre a quantidade de alginato presente na composição do filme e a sua hidrofiliabilidade, com a exceção do filme 25-75-HA-C2L. Como possível justificação desta diferença aponta-se a existência de fraturas no revestimento de HA do filme (Figura 4.2 i)) que podem ter levado a uma maior absorção da gota e logo a um menor ângulo de contacto.

Segundo um estudo conduzido por Liu et al. (2007), resultados prévios indicaram que uma superfície hidrofílica com um ângulo de contacto com a água inferior a 60 ° demonstrava uma maior adesão de células. Com base nessa evidência, é possível concluir que o filme que obteve os melhores resultados foi o 75-25-C1L-HA, apresentando um ângulo de 9,0 °. O ângulo de contacto mais baixo, indicativo de maior molhabilidade. Essa característica pode ser benéfica para promover a adesão celular e a colonização pelos tecidos circundantes. Superfícies mais hidrofílicas tendem a facilitar a interação com fluidos biológicos e células, contribuindo para a eficácia do filme em aplicações específicas, como regeneração óssea.

4.1.5 Testes de absorção

Para a condução dos ensaios de absorção, foram utilizados cinco filmes, com três composições relativas de alginato e ι-carragenina, 75%/25%, 50%/50%, e 75%/25%, respectivamente.

A Figura 4.6 apresenta as variações da taxa de absorção ao longo do tempo para cada filme testado, nomeadamente: a) Sem HA (C1L); b) Sem HA (C2L); c) Com HA (HA-C1L); d) Com HA (HA-C2L); e e) C1L-HA.

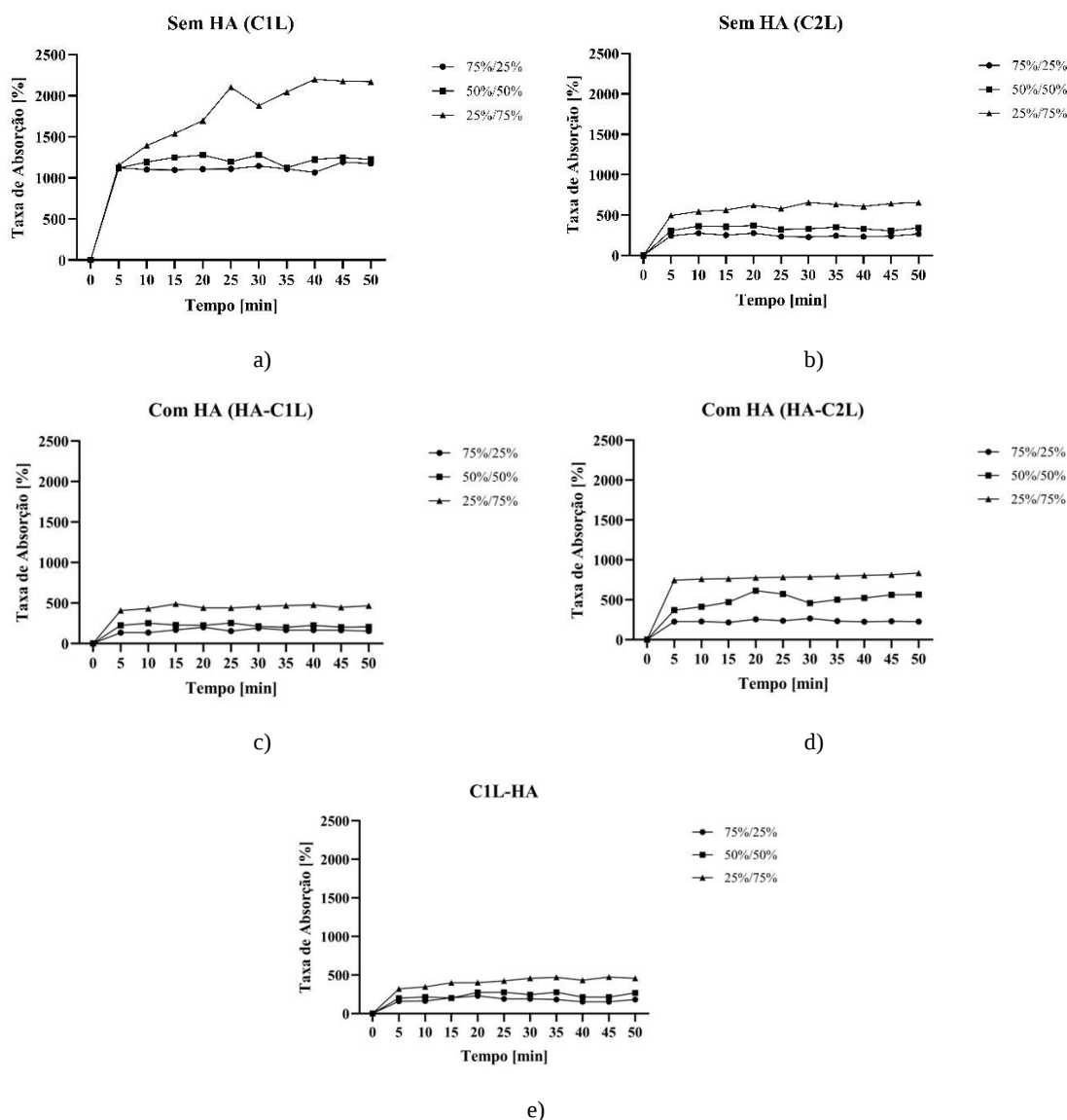


Figura 4.6 - Resultados do ensaio de absorção: a) Sem HA (C1L); b) Sem HA (C2L); c) Com HA (HA-C1L); d) Com HA (HA-C2L); e) C1L-HA

Os resultados evidenciaram variações significativas nos níveis de absorção entre os diferentes filmes analisados. É possível verificar que o tipo de cura utilizada (C1L e C2L) exerce uma influência sobre a taxa de absorção dos filmes. O cloreto de cálcio atua como agente de reticulação, promovendo ligações cruzadas no alginato e ι-carragenina, culminando na gelificação do filme. A densidade dessas ligações cruzadas impacta a estrutura do filme, sendo que uma rede mais densa pode restringir a absorção de água, resultando numa menor taxa de absorção. O tempo de exposição do filme à solução de cura também afeta o grau de reticulação, conduzindo a distintos comportamentos de absorção. A reticulação do polímero pode, adicionalmente, modificar a porosidade do filme, com uma estrutura mais compacta limitando a entrada de água e, consequentemente, afetando a absorção.

Após imersão na água destilada, as amostras iniciaram a absorção do solvente, culminando no aumento da sua massa. Verificou-se um aumento progressivo nos primeiros

25 minutos, enquanto, nos subsequentes 25 minutos do ensaio, a massa dos filmes permaneceu praticamente inalterada, apresentando um valor máximo de absorção de 2103% no filme 25-75-C1L e um valor mínimo de 424% no filme 75-25-C1L-HA.

Verificou-se, portanto, que os filmes submetidos à C2L apresentaram, de forma geral, uma taxa de absorção inferior em comparação com os filmes submetidos à C1L. No caso dos filmes Sem HA (C2L), houve uma diminuição média de 72%, enquanto nos filmes Com HA (HA-C2L), não se verificam diferenças significativas. Este facto pode ser atribuído à densa reticulação em ambas as faces, resultando na redução da porosidade do filme e, por conseguinte, na diminuição da absorção.

Foi ainda observada a existência de uma uniformidade entre todos os filmes com composições relativas de alginato/ ι -carragenina 25%/75%, respetivamente, os quais exibiram uma taxa de absorção superior em relação às demais composições, apresentando um valor máximo de 2199% no filme 25-75-C1L. Essa evidência sugere que a presença de concentrações mais elevadas de ι -carragenina exerce um impacto na capacidade de absorção dos filmes, possibilitando uma maior taxa de absorção. Em comparação com as composições relativas de alginato/ ι -carragenina 75%/25% (valor máximo de 1192%, no filme 75-25-C1L) ($p < 0.001$), verifica-se que, apesar de o alginato ser inerentemente hidrofílico, a sua combinação com a ι -carragenina resulta numa redução na taxa de absorção.

No que diz respeito à incorporação de HA na solução filmogénica verificaram-se resultados contraditórios. Para os filmes curados apenas numa face, os filmes contendo HA apresentaram taxas de absorção 80% inferiores em relação a filmes sem HA na sua composição. Tal fenómeno pode estar associado à interferência da HA na formação de ligações cruzadas entre cadeias poliméricas, o que limitou a absorção de água pelos filmes HA-C1L. No entanto os filmes curados em ambos os lados apresentaram um comportamento inverso. Os filmes HA-C2L apresentaram uma taxa de absorção média 1386%, 74% superior à dos filmes C2L. Assume-se que o processo de cura tenha estabilizado a estrutura do gel de uma forma mais eficiente, reduzindo a sua capacidade de absorção, o que explica que não se tenham encontrado diferenças significativas entre estes.

Em relação à introdução de HA durante o processo de cura, os filmes C1L demonstram valores superiores de absorção em comparação com os C1L-HA. Os filmes Sem HA (C1L) apresentaram uma taxa média de absorção de 1264%, enquanto os filmes C1L-HA apresentaram 254%, resultando numa redução de 80% na taxa de absorção. O mesmo pode ser explicado pela capacidade da HA, enquanto material sólido, de preencher os espaços na estrutura porosa do filme, reduzindo assim a sua capacidade de absorver água.

Em última análise, é possível inferir que os filmes 25-75-C1L demonstraram desempenho superior, uma vez que a taxa de absorção é uma propriedade vantajosa para materiais de curativos. O facto de esses filmes absorverem mais água sugere uma maior porosidade, desempenhando um

papel crucial na estimulação da migração celular e facilitando a entrada dos fluidos necessários para a regeneração. Essa propriedade pode ser estrategicamente explorada para impregnar os filmes com fármacos e agentes antimicrobianos, contribuindo assim para o tratamento eficaz de lesões.

Por forma a comparar os resultados obtidos com as informações encontradas na literatura, analisou-se um estudo conduzido por Fadeeva et al. (2021), no qual foram produzidos filmes contendo polivinilpirrolidona (PVP) (45%), alginato de cálcio (45%) e HA (10%). Estes filmes foram produzidos adicionando o PVP, alginato de sódio e a HA a 95 mL de água destilada. Posteriormente, a cura foi realizada com uma solução de cloreto de cálcio, na qual os filmes foram imersos por 5 minutos. Ao analisar os resultados obtidos no estudo mencionado, foi possível verificar que os filmes 25-75-HA-C2L apresentaram uma taxa de absorção máxima de 835%, enquanto nos filmes de PVP, alginato e HA, a absorção máxima foi de 375%, resultando em uma redução de 55%. A diferença fundamental entre estudos foi a adição de PVP do filme, pelo que se conclui que este leva a uma redução da absorção de água.

Por forma a realizar uma comparação mais representativa, analisou-se um estudo realizado por Pereira et al. (2013) Nesse estudo foram produzidos filmes de alginato de sódio (1,5% p/v) e aloé vera (1,5% p/v). Primeiramente, o alginato e o aloé vera foram dissolvidos em água destilada, de seguida foi adicionado glicerol (15% m/m, com base na massa do alginato) como agente plasticizante. Posteriormente, as soluções de alginato e aloé vera foram misturadas para obter as proporções finais de alginato/alocé vera (v/v) de 100:0 (filme AG), 95:5 (filme AGA5), 85:15 (filme AGA15) e 75:25 (filme AGA25). Por fim, os filmes foram imersos numa solução de cura de cloreto de cálcio (5,0% p/v), durante 5 minutos. Os ensaios de absorção foram conduzidos numa solução tampão acetato pH 5,5 a 37 °C, onde os filmes foram submersos por 1440 minutos. Através da análise desses ensaios, foi possível verificar que o filme que apresentou uma maior absorção foi o AGA25, com 135% aos 50 minutos. Em comparação com os resultados obtidos neste ensaio, o filme que demonstrou a maior taxa de absorção foi o 25-75-C1L, apresentando uma taxa de absorção de 1223%. A principal diferença entre estudos foi a adição de aloé vera e do glicerol como agente plasticizante no filme, assim como, o tipo de solução utilizada no ensaio. Conclui-se, portanto, que essas alterações resultam numa redução na taxa de absorção.

4.1.6 Teste de degradação

Os ensaios de degradação desempenham uma função essencial na avaliação da dinâmica e da performance dos filmes. Este estudo foi realizado numa solução de PBS, mantida a 37 °C, ao longo de um período de 1, 2, 3 e 4 semanas, nos filmes identificados como: Sem HA (C1L), Sem HA (C2L), Com HA (HA-C1L), Com HA (HA-C2L) e C1L-HA.

Além disso, é relevante salientar que os filmes analisados possuem uma composição base de 75%/25% de alginato/ ι-carragenina, respetivamente. Essa escolha baseou-se na análise prévia

dos resultados, nomeadamente nos ensaios de tração, onde se constatou que esta composição apresentava as melhores propriedades mecânicas. Os resultados deste ensaio encontram-se apresentados na Figura 4.7.

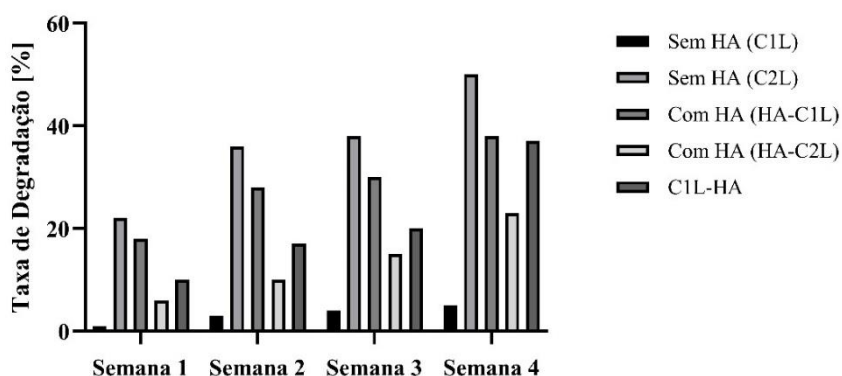


Figura 4.7 - Comportamento de degradação *in vitro*, nos filmes Sem HA (C1L), Sem HA (C2L), Com HA (HA-C1L), Com HA (HA-C2L) e C1L-HA

Por meio da análise dos resultados obtidos, verificou-se uma disparidade nas taxas de degradação entre os filmes Sem HA (C1L, C2L). Os resultados revelaram valores inferiores de degradação nos filmes C1L, apresentando uma redução do valor da taxa média de degradação de 93%, comparativamente com os filmes Sem HA (C2L). O mesmo poderá ser explicado, através de uma comparação com os resultados obtidos nos ensaios de absorção, onde se verificou que os filmes Sem HA (C1L) apresentaram a maior taxa de absorção (Figura 4.6) e como tal, assume-se que permaneceu mais estável. Uma potencial explicação reside na distribuição assimétrica de materiais induzida pela C1L. A formação de gradientes de propriedades mecânicas ao longo dos filmes pode influenciar a resposta à degradação, resultando em valores mais baixos. Além do referido, a exposição diferencial aos fatores de degradação pode ter influenciado as taxas observadas (Daniel et al., 2015).

Nos filmes Com HA, a C2L revelou taxas inferiores de degradação em comparação com C1L. O valor máximo de taxa de degradação dos filmes HA-C2L foi de 23%, ao passo que nos filmes HA-C1L foi de 38%, apresentando assim uma redução de 40%. O mesmo pode ser atribuído à capacidade da C2L de promover uma melhor adesão e integração do material, incluindo a hidroxiapatite, ao substrato do filme. Uma melhor adesão pode conferir maior resistência à degradação, culminando em valores mais baixos.

Em relação aos filmes HA-C1L, estes apresentaram valores consideravelmente superiores em comparação com os filmes Sem HA (C1L). A taxa de degradação observada nos filmes HA-C1L foi de 17%, enquanto nos filmes Sem HA (C1L) foi de 2%, resultando em um aumento de 88%. Conforme verificado no ponto anterior a introdução de HA na solução filmogénica afetou a sua capacidade de absorção, fazendo com que estes filmes apresentem um comportamento semelhante aos filmes curados nos dois lados. Como explicação para este comportamento está a presença de cálcio que contribuiu para a cura do filme HA-C1L.

Ao longo das quatro semanas de ensaio, observou-se visualmente desagregação dos filmes Sem HA (C2L), Com HA (HA-C1L) e C1L-HA, restando apenas intactos os filmes Sem HA (C1L) e Com HA (HA-C2L).

Conclui-se, portanto, que os filmes que evidenciaram um desempenho mais eficaz frente à degradação foram os filmes Sem HA (C1L) e os filmes Com HA (HA-C2L).

Por forma a comparar os resultados obtidos dos ensaios de degradação num estudo analisado anteriormente, conduzido por Pereira et al. (2013). Nesse estudo, ao analisar os resultados dos ensaios de degradação, foi possível verificar que o filme que apresentou uma taxa de degradação inferior após quatro semanas foi o filme AG, com um valor de 8%. Comparando com os resultados obtidos neste estudo, os filmes que se degradaram menos foram os filmes Sem HA (C1L), com um valor médio de 5%.

4.2 Testes *In-vitro*

4.2.1 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi conduzido utilizando uma linha celular não tumoral mamária, selecionada devido à ausência viável de osteoblastos em tempo útil deste estudo. O objetivo principal consistiu na realização de uma análise empírica da viabilidade celular nos filmes desenvolvidos, optando-se pela utilização das células MCF-10A.

Neste estudo analisou-se a viabilidade celular dos filmes: Sem HA (C1L), Sem HA(C2L), Com HA (HA-C1L), Com HA (HA-C2L) e C1L-HA, utilizando células não tumorais mamárias MCF-10. Avaliou-se diferentes configurações de cura, incluindo C1L e C2L e C1L-HA além de um grupo controlo, com o objetivo de compreender o potencial desses filmes na regeneração óssea. Os resultados encontram-se ilustrados na Figura 4.8:

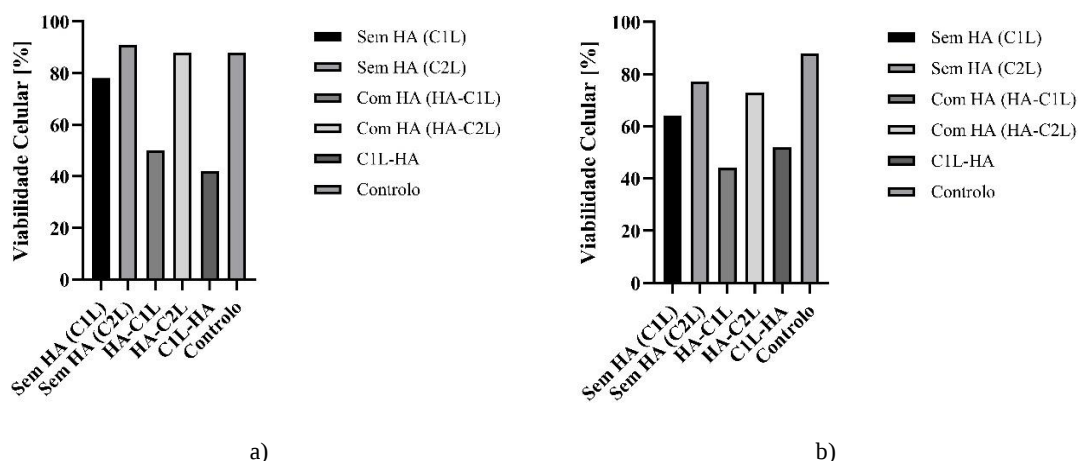


Figura 4.8 - Resultados do ensaio de viabilidade celular nos filmes Sem HA (C1L), Sem HA (C2L), Com HA (C1L), Com HA (C2L) e C1L-HA, após 48 horas

Os resultados obtidos evidenciaram diferenças significativas na viabilidade celular entre os grupos experimentais. No gráfico a), observa-se uma diferença notável entre C1L e C2L, sendo

que C2L apresenta uma maior percentagem de células viáveis. No caso dos filmes Sem HA (91% e 78%), essa diferença é de 13%, enquanto nos filmes Com HA (88% e 50%) é de 38%.

Constatou-se, também, que os filmes que continham hidroxiapatite na sua constituição apresentavam valores inferiores de viabilidade celular em comparação com os filmes Sem HA. Observou-se uma diferença de 28% entre Sem HA (C1L) (78%) e Com HA (HA-C1L) (50%), e uma diferença de 3% entre Sem HA (C2L) (91%) e Com HA (HA-C2L) (88%).

Em relação ao filme C1L-HA (42%), este apresentou um desempenho notavelmente inferior quando comparado com o filme Sem HA-C1L (78%), exibindo uma diferença de 35%.

O filme que se destacou com resultados superiores em comparação com o grupo de controlo (88%) foi o filme Sem HA (C2L) (91%), superando-o em 3%.

Passando à análise do gráfico b), é possível afirmar que o mesmo padrão de comportamento observado no gráfico a) foi corroborado. O tipo de cura impactou a quantidade de células viáveis, especificamente nos filmes Sem HA (77% e 64%), a diferença sendo de 33%, e nos filmes Com HA (73% e 44%), atingindo 29%.

Verificou-se, adicionalmente, que a presença de HA reduziu o número de células viáveis, apresentando uma diferença de 20% entre os filmes Sem HA (C1L) (64%) e o filme Com HA (HA-C1L) (44%), e uma discrepância de 4% entre o filme Sem HA (C2L) (77%) e o filme Com HA (HA-C2L) (73%).

No que concerne ao filme C1L-HA, este apresentou uma viabilidade ligeiramente superior relativamente ao gráfico a). Quando comparado ao filme Sem HA-C1L (64%), C1L-HA (52%) revelou um desempenho inferior, apresentando uma diferença de 12%. Novamente, o filme que se destacou com resultados superiores em comparação com o controlo foi o filme Sem HA-C2L, sendo inferior em 11%.

Comparando, de uma forma geral os gráficos a) e b), é possível constatar que a viabilidade celular dos filmes baixou ligeiramente, apresentando diferenças de: Sem HA (C1L) de 14%, Sem HA (C2L) de 14%, Com HA (HA-C1L) de 6%, Com HA (HA-C2L) de 15% e C1L-HA de 10%.

Inicialmente, após a preparação das placas de poços com as amostras dos filmes, procedia-se à esterilização das mesmas, submetendo-as à luz UV por 15 minutos. Contudo, após mais de 48 horas da realização do processo de cultura de células, os filmes ficavam contaminados por fungos, inviabilizando os testes devido à morte celular (os resultados até 48 horas encontram-se evidenciados no gráfico a). Na sequência desses eventos, tornou-se imprescindível adotar uma abordagem alternativa de esterilização.

Como método primário de esterilização, procedeu-se à autoclavagem direta dos filmes a uma temperatura de 120 °C, mantendo uma pressão de 1 bar. Observou-se uma deterioração acentuada das propriedades mecânicas dos filmes, tornando-os secos e quebradiços. Este fenómeno pode ser atribuído à degradação térmica do alginato quando submetido a altas

temperaturas, resultando na quebra das cadeias poliméricas e na redução das suas propriedades físicas e químicas.

Dado o referido, foi necessário adotar uma abordagem alternativa de esterilização viável. Esta consistiu na autoclavagem das soluções dos filmes, com exceção do alginato na sua composição, bem como das soluções de cura. Posteriormente, o alginato foi adicionado às soluções e homogeneizado por agitação magnética a 2.000 rpm durante 20 minutos, a uma temperatura de 60 °C. Por fim, os filmes foram secos e curados, conforme mencionado anteriormente.

A eficácia deste método foi comprovada pela preparação de uma placa com os filmes e as células, que permaneceram sem contaminações durante 96 horas. Posteriormente procedeu-se à realização de um replicado técnico das mesmas, resultando nos dados apresentados no gráfico b).

Quanto à análise dos resultados obtidos, é possível constatar que o tipo de cura utilizado exerceu uma influência significativa na viabilidade celular, destacando-se, sobretudo, a C2L. Esta tendência pode ser atribuída a uma distribuição mais uniforme dos reagentes nos filmes, criando um ambiente mais propício para as células. A técnica C2L pode conferir maior estabilidade estrutural ao filme, reduzindo deformações ou desintegrações que poderiam ocorrer com a cura unilateral. Além disso, essa abordagem pode aumentar a superfície de contato disponível para as células aderirem e proliferarem. Adicionalmente, pode permitir que as células tenham acesso equitativo a nutrientes essenciais e fatores de crescimento presentes no meio de cultura celular, aspecto crucial para sustentar a proliferação celular e a manutenção da viabilidade ao longo do tempo.

Observou-se também, que a inclusão de hidroxiapatite na constituição dos filmes resultou numa diminuição do número de células viáveis nos mesmos. Tal poderá dever-se a vários fatores:

- As propriedades da HA não serem compatíveis com as necessidades específicas das células não tumorais mamárias, tais como propriedades de aderência ou sinalização bioquímica, resultando numa redução na afinidade;
- A superfície dos filmes contendo HA pode não proporcionar uma adesão ou interação adequada com as células, devido a características como rugosidade, topografia e carga superficial;
- As células não tumorais mamárias podem não expressar os recetores celulares necessários para interagir eficazmente com a HA. A expressão de proteínas de superfície celular específicas pode variar entre tipos celulares, influenciando a afinidade com determinados substratos.

Ao comparar os dois gráficos, constata-se que a esterilização exerceu uma pequena influência na viabilidade celular. Durante as primeiras 48 horas, o gráfico a) revelou resultados ligeiramente superiores, entretanto, após esse período, evidenciou-se a presença de fungos, levando à morte celular. Em contrapartida, no gráfico b), observa-se, por meio de uma análise

externa, que as células mantiveram a sua capacidade proliferativa após as 48 horas, indicando a eficácia do processo de esterilização utilizado.

Por fim, é possível afirmar que o filme Sem HA (C2L) apresentou a maior percentagem de células viáveis, destacando-se como o filme mais eficiente.

4.2.2 Análise morfológica da cultura celular

A análise morfológica da cultura celular nos filmes proporciona uma compreensão mais aprofundada da interação celular com os substratos em análise. As imagens da morfologia das células nos filmes, capturadas após 24 e 48 horas com uma ampliação total de 50x nos filmes: Sem HA (C1L), Sem HA (C2L), Com HA (HA-C1L), Com HA (HA-C2L) e C1L-HA, permitiram uma avaliação das alterações morfológicas ao longo do tempo. Estas imagens encontram-se apresentadas na Figura 4.9.

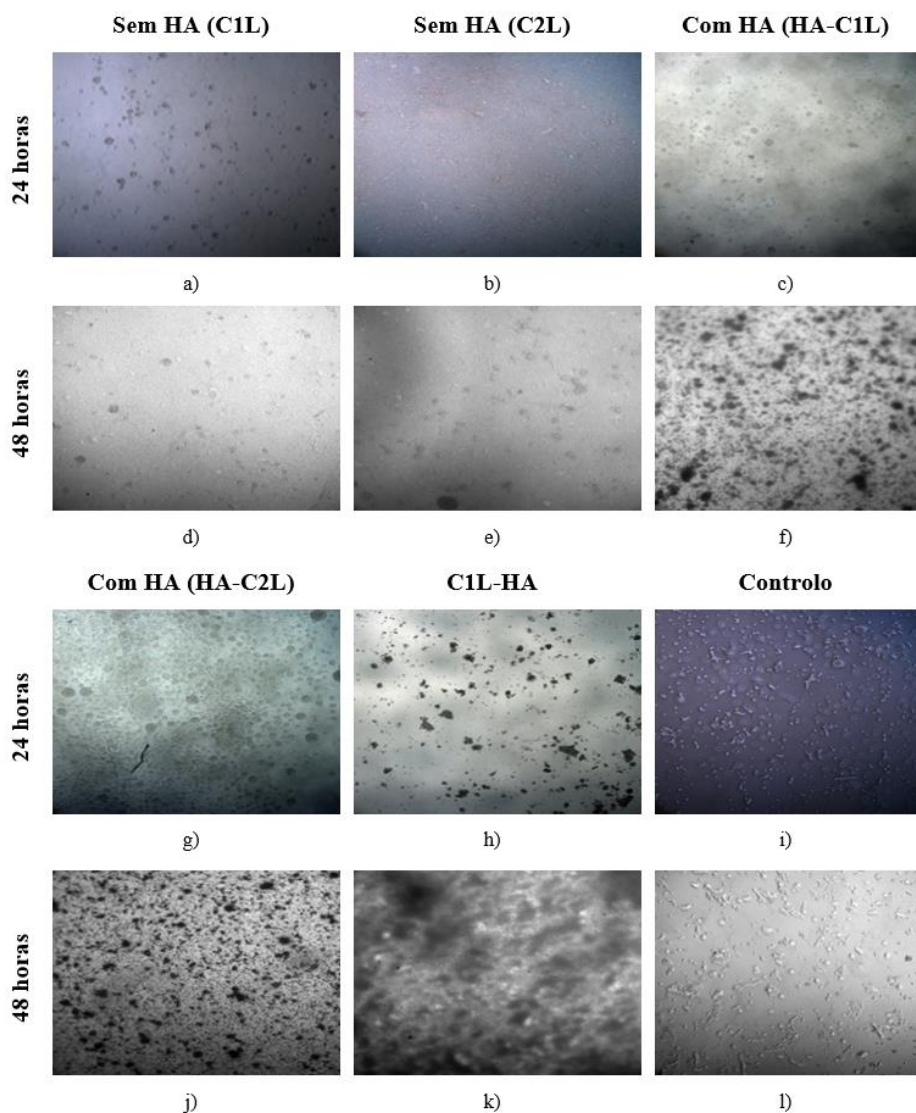


Figura 4.9 - Morfologia das células, com ampliação 50x, dos filmes Sem HA (C1L), Sem HA (C2L), Com HA (HA-C1L), Com HA (HA-C2L) e C1L-HA, após 24 horas (a), b), c), g), h) e i), respetivamente) e 48 horas (d), e), f), j), k) e l), respetivamente)

Numa fase inicial, após 24 horas, foi observada uma adesão inicial das células à superfície de todos os filmes. Essa aderência inicial é crucial para estabelecer a integridade da cultura celular nos filmes.

À medida que o tempo avançou até as 48 horas, verificou-se um aumento na densidade celular, especificamente nos filmes contendo HA na sua composição. Esse resultado corrobora a análise previamente conduzida relativa à viabilidade celular. Este desenvolvimento indica uma resposta positiva das células à composição do filme, evidenciando um ambiente propício para o crescimento celular.

Utilizou-se um grupo de controlo como referência, uma vez que era de conhecimento comum que as células adeririam e proliferariam nesse cenário. Essa abordagem proporcionou uma base sólida para a comparação das respostas celulares nos filmes em estudo, permitindo uma avaliação mais precisa das variações observadas.

É relevante mencionar que os filmes apresentam uma superfície opaca, o que inviabiliza a penetração da luz do microscópio para uma visualização mais nítida das células.

Finalmente, é possível inferir que os resultados da análise morfológica proporcionaram uma compreensão bastante superficial da cultura celular nos filmes ao longo do tempo.

4.2.3 Proliferação celular

Na análise da proliferação celular, a coloração nuclear proporcionada pelo DAPI permitiu uma avaliação precisa do número de células em diferentes condições experimentais, nomeadamente nos filmes: Sem HA (C1L), Sem HA (C2L), Com HA (HA-C1L), Com HA (HA-C2L) e C1L-HA, após 48 horas. As imagens obtidas encontram-se representadas na Figura 4.10.

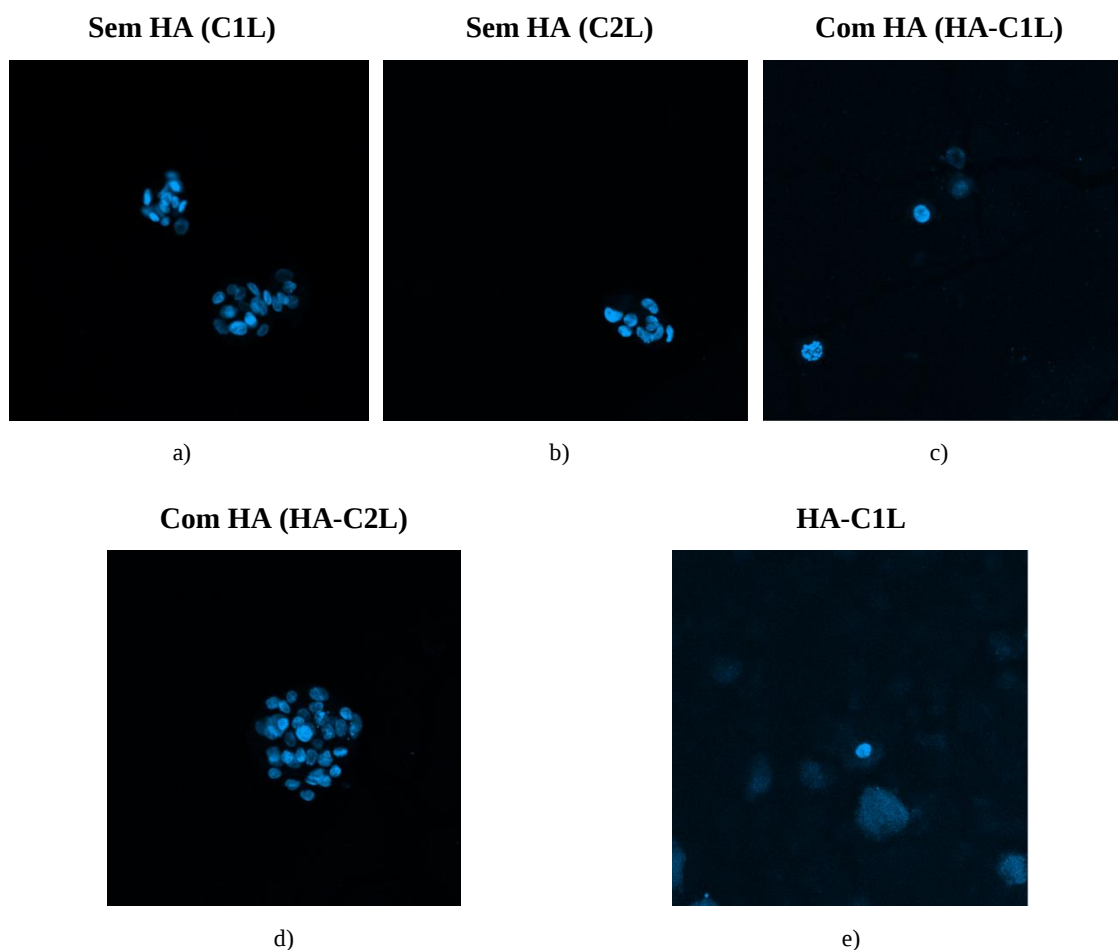


Figura 4.10 - Resultados do ensaio de proliferação celular nos filmes a) Sem HA (C1L), b) Sem HA (C2L), c) Com HA (HA-C1L), d) Com HA (HA-C2L) e e) C1L-HA, após 48 horas

Na análise das imagens obtidas, foram identificadas variações na densidade celular entre os diferentes filmes. Essas variações sugerem que a composição específica dos filmes exerceu uma influência significativa na proliferação celular ao longo do período de observação. Notavelmente, os filmes Sem HA (C2L) manifestaram uma proliferação celular menos pronunciada em comparação com os Sem HA (C1L).

Nos filmes com HA na sua composição, observou-se uma dinâmica inversa, sendo que a C2L evidenciou uma densidade celular consideravelmente superior, acompanhada de uma organização celular mais homogênea, sugerindo um ambiente propício ao crescimento e expansão celular.

Ao comparar o filme Sem HA (C1L) com o C1L-HA, torna-se evidente que a presença de HA na superfície do filme exerceu um impacto desfavorável na proliferação celular, refletindo-se na observação de um número reduzido de núcleos.

Contudo, os resultados obtidos revelam incongruências com as análises anteriormente referidas. Essas inconsistências podem ser atribuídas ao fato de que as amostras analisadas foram submetidas a cortes dos filmes iniciais (24 mm x 24 mm) para dimensões aproximadas de

5 mm x 5 mm. Nada assegura que a área cortada possuía uma escassez de células, uma vez que a distribuição pode variar ao longo da superfície dos filmes. A fim de mitigar essa limitação, no processo de cultura celular, as células deveriam ser incorporadas em filmes previamente cortados nas dimensões necessárias para a montagem das lâminas, garantindo, assim, uma visualização integral da superfície de cada filme e uma análise mais fidedigna.

5 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

5.1 Síntese do trabalho

O tecido ósseo humano é um componente essencial para o sistema esquelético e divide-se em três principais tipos morfológicos: osso trabecular, osso cortical e osso subcondral. O osso esponjoso ocupa a região interna, o osso compacto constitui a camada externa, e o osso subcondral, uma camada lisa, reside nas epífises dos ossos, desempenhando um papel crucial na regeneração cartilaginosa.

O osso possui na sua constituição matriz óssea, cuja função principal é conferir propriedades biomecânicas e bioquímicas ao tecido ósseo, esta é composta por dois componentes primários: orgânicos e inorgânicos. O tecido ósseo também inclui células, como osteoclastos, contribuindo para a remodelação óssea, osteoblastos, responsáveis pela formação e mineralização óssea, e osteócitos, essenciais na homeostase e adaptação do tecido ósseo. Adicionalmente, células de revestimento ósseo atuam como sistema regulatório da saúde óssea, garantindo a sua integridade e funcionalidade ao longo do tempo.

A remodelação óssea é um processo fundamental, que desempenha funções como adaptação às tensões mecânicas, reparação de microtraumatismos e fraturas, e controlo da homeostase mineral. Esta ocorre em quatro fases: reabsorção, reversão, formação e mineralização. A regeneração óssea é um processo complexo que ocorre em lesões ósseas de pequena escala. O processo de cicatrização óssea, é caracterizado por três fases: a fase inicial inflamatória, a fase de reparação óssea e a fase final de remodelação óssea.

O tecido ósseo possui uma capacidade natural de regeneração, contudo traumas severos ou patologias podem resultar em defeitos ósseos críticos. Esses defeitos podem ser desencadeados por diversos fatores, como traumas, patologias específicas, anomalias congénitas ou procedimentos cirúrgicos. Além disso, os defeitos podem estar associados a um contexto fisiopatológico, como envelhecimento populacional, cancro no tecido ósseo e infeções.

Em cenários que envolvem perda óssea substancial, decorrente de traumas graves ou patologias, surge a necessidade de soluções terapêuticas e estratégias de regeneração. Existem diversas opções, incluindo enxertos ósseos: autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos. Além disso, existem também materiais de enchimento, como matriz óssea desmineralizada, cimento ósseo e fosfatos de cálcio, com o objetivo de preencher integralmente falhas ósseas. Outra estratégia terapêutica é a engenharia de tecidos ósseos, onde se identificam três parâmetros essenciais: a criação de estruturas biocompatíveis replicando a matriz extracelular dos ossos naturais, a utilização de células com potencial osteogénico e a incorporação de componentes bioativos sinalizando para atrair células e direcioná-las à diferenciação osteogénica.

Os filmes surgem como uma alternativa à regeneração, desempenhando papel crucial na recuperação de tecidos danificados, especialmente no desenvolvimento de novo tecido ósseo. Produzidos geralmente com materiais biocompatíveis, esses revestimentos finos são aplicados diretamente no local da lesão ou defeito ósseo, providenciando, libertação controlada de fatores de crescimento, moldagem personalizada, proteção, isolamento, adesão ao tecido e indução de diferenciação celular. A fabricação dos filmes pode ocorrer por diversas técnicas, incluindo as convencionais (vazamento por molde e técnica de imersão) e avançadas (eletrofição e deposição por camada). Os filmes requerem processo de cura, existindo diversas abordagens, como cura por imersão, térmica, por radiação, por humidade e química.

Através deste trabalho de investigação, foram desenvolvidos filmes destinados à regeneração óssea, compostos por alginato, ι-carragenina, HA e D-sorbitol. Produziram-se cinco configurações distintas, totalizando 15 composições variando a proporção entre alginato e ι-carragenina em peso relativo (75%/25%, 50%/50% e 75%/25%). O D-sorbitol foi adicionado a todos os filmes como agente plasticizante, em quantidade equivalente à massa dos materiais filmogénicos. O processo de cura ocorreu por imersão em solução de cloreto de cálcio em um ou ambos os lados do filme, e a introdução de HA foi feita tanto diretamente na solução filmogénica quanto na solução de cura, garantindo a deposição apenas no lado curado do filme.

Posteriormente, realizou-se a caracterização morfológica e físico-química dos filmes. Inicialmente, foi analisada a morfologia da superfície dos diversos filmes. Em seguida, foram conduzidos ensaios reológicos para avaliar a viscosidade das soluções filmogénicas base (Com HA e Sem HA). Foram realizados ensaios mecânicos, como ensaios de tração, e a configuração com as melhores propriedades mecânicas foi selecionada com base nesses resultados. Subsequentemente, foram realizados ensaios de molhabilidade por ângulo de contato com o objetivo de avaliar o comportamento superficial dos filmes. Posteriormente, ensaios de absorção foram realizados para avaliar a capacidade de os filmes absorverem líquidos e expandirem. Por fim, ensaios de degradação foram conduzidos visando avaliar a estabilidade e durabilidade dos filmes ao longo do tempo.

Em seguida, foram realizados testes *in vitro*, com o objetivo de avaliar a eficácia dos filmes. Uma cultura de células foi realizada recorrendo à utilização de uma linha alternativa de células não tumorais mamárias MCF-10A, onde as células foram cultivadas em cinco tipos de filmes: Sem HA (C1L), Sem HA (C2L), Com HA (HA-C1L), Com HA (HA-C2L) e com HA na solução de cura (C1L-HA). A viabilidade celular foi analisada por meio de contagem de células aderentes aos filmes, seguida por uma análise morfológica das células na superfície dos mesmos. Por fim, um ensaio de proliferação celular foi realizado utilizando a técnica de coloração DAPI com a finalidade de observar a morfologia dos núcleos das células e a sua distribuição ao longo do filme.

5.2 Conclusões

Tendo em conta o trabalho desenvolvido, considera-se que os objetivos estabelecidos foram alcançados. Primeiramente, o primeiro objetivo consistia no desenvolvimento de vários filmes, com o propósito de compreender, qual a composição e método de cura que apresentava melhores resultados. O mesmo foi alcançado durante a realização dos ensaios de caracterização dos filmes. O segundo grande objetivo, passou pela validação dos filmes enquanto estratégia terapêutica de regeneração do osso, o mesmo foi alcançado com base nos resultados obtidos nos ensaios *in-vitro*, onde se observou adesão e proliferação das células nos filmes desenvolvidos.

Em conclusão, o estudo investigou a influência das composições dos filmes e do tipo de cura, com potencial aplicação na regeneração óssea.

Através da análise da morfologia dos filmes foi possível constatar, que numa baixa ampliação (200x) os filmes Sem HA e Com HA não apresentaram diferenças visíveis na superfície, exibindo uma homogeneidade de cores indicativa de uma mistura eficaz das fases. No entanto, em algumas imagens, foram observadas cores distintas, sugerindo a presença de duas fases não completamente solubilizadas. Os filmes C1L-HA revelaram uma superfície rugosa devido à deposição de HA, destacando-se partículas de grande dimensão (5 a 10 μm) resultantes do processo de deposição durante a cura. As imagens de alta ampliação (2000x) permitiram analisar o tamanho e a geometria dos poros. Não foram identificadas diferenças significativas na morfologia do filme para diferentes composições base. Em algumas imagens, foi possível visualizar segregações na superfície, que possivelmente podem ser atribuídas a microfissuras resultantes de diferentes velocidades de secagem das soluções filmogénicas, com zonas ricas em alginato e ι -carragenina. Os filmes Sem HA apresentaram mais segregações.

Nos ensaios reológicos, verificou-se que concentrações de 75%/25% revelaram os valores mais altos de viscosidade, enquanto as concentrações de 25%/75% apresentaram os valores mais baixos. Assim, é possível inferir que a presença de concentrações superiores de alginato confere à solução uma maior viscosidade. A adição de HA na solução filmogénica resultou numa diminuição da viscosidade. Por fim, verificou-se que a solução que evidenciou viscosidade mais elevada foi a solução Sem HA 75%/25%.

A partir da análise dos resultados obtidos nos ensaios de tração, foi possível concluir que a composição base 75%/25% demonstrou os melhores resultados, evidenciando valores superiores de módulo de *Young*, tensão de cedência e carga máxima. Essa constatação sugere que maiores proporções de alginato contribuem para a melhoria das propriedades mecânicas dos filmes. Além disso, observou-se que o processo de cura influencia as propriedades mecânicas dos filmes, no caso dos filmes Sem HA, a cura de ambos os lados apresentou resultados superiores em comparação com a cura de um lado apenas. A justificação para os resultados anteriores prende-se com a capacidade do alginato em interagir com os iões de cálcio, amplamente

disponíveis quando a cura é feita em ambos os lados. No entanto, nos filmes Com HA, a tendência foi inversa, com os filmes HA-C1L apresentando desempenho superior aos HA-C2L. Verificou-se também que a incorporação de HA direta nos filmes ou durante o processo de cura resultou na diminuição das propriedades mecânicas, evidenciada pela redução nos valores de módulo de *Young*, tensão de cedência e carga máxima. Comportamento possivelmente explicado pela introdução de defeitos na estrutura do filme pelas partículas de HA. Por fim, ao comparar os resultados obtidos com as propriedades mecânicas do osso cortical, é possível afirmar que o filme mais congruente com as características ósseas foi o filme 75-25-C2L, destacando-se, portanto, por apresentar as melhores propriedades mecânicas.

Através da análise dos ensaios de molhabilidade por ângulo de contato, observou-se que alguns dos filmes submetidos à cura em apenas um lado, apresentaram valores inferiores de ângulos de contato em comparação com os filmes curados em ambos os lados. Foi constatado que a presença de HA na solução de cura (filmes C1L-HA) conferiu maior hidrofiliabilidade às superfícies. Este efeito pode ser atribuído ao fato de a gota ser absorvida imediatamente pelo filme, especialmente pela camada de HA que se depositou sobre o filme durante o processo de cura.

Através dos ensaios de absorção, foi possível concluir que os filmes C2L apresentaram, de forma geral, uma taxa de absorção inferior em comparação com os filmes C1L. Observou-se, que filmes contendo HA apresentaram taxas de absorção inferiores em relação a filmes sem HA na sua composição. Por fim, os filmes sem HA na sua composição (C1L), apresentaram valores superiores em comparação com a C1L-HA.

Nos ensaios de degradação foi possível verificar que os filmes que evidenciaram um desempenho mais eficaz frente à degradação, ou seja, apresentaram valores inferiores, foram os filmes C1L e os filmes HA-C2L.

As conclusões obtidas a partir dos ensaios biológicos, nomeadamente na viabilidade celular, indicaram que o tipo de esterilização exerceu uma influência significativa na eficiência do filme. A esterilização por luz UV durante 15 minutos não se revelou suficiente para eliminar a contaminação por fungos, no entanto, a nova abordagem de esterilização, através da autoclavagem da solução filmogénica, foi eficaz em colmatar essa lacuna. O tipo de cura utilizado também teve um impacto significativo na viabilidade celular, destacando-se, sobretudo, a C2L. Além do referido, a inclusão de hidroxiapatite na composição dos filmes resultou numa diminuição do número de células viáveis nos mesmos. Em suma, é possível afirmar que o filme Sem HA (C2L) apresentou a maior percentagem de células viáveis, destacando-se como o filme mais eficiente.

No que diz respeito às conclusões retiradas dos ensaios de proliferação celular, observou-se que os filmes Sem HA (C2L) apresentaram uma proliferação celular menos pronunciada em comparação com os Sem HA (C1L). Verificou-se também que a presença de HA na superfície do

filme teve um impacto desfavorável na proliferação celular. Em última análise, os resultados obtidos neste ensaio revelam incongruências com as análises anteriormente referidas.

5.3 Perspetivas Futuras

Tendo em conta os excelentes resultados obtidos neste estudo, a par da relevância do assunto tratado, surge a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre esta estratégia de regeneração óssea. Desta forma, são enunciadas algumas possibilidades de estudos a realizar.

Primeiro aspeto a ser explorado é a incorporação de agentes terapêuticos para potencializar ainda mais a capacidade de regeneração dos filmes, nomeadamente a incorporação de nanopartículas de prata. Estas possuem propriedades antimicrobianas eficazes, inibindo o crescimento de bactérias e outros microrganismos, um aspeto crucial em ambientes de regeneração óssea para prevenir infeções. Além da ação antimicrobiana, as nanopartículas de prata também têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias, que podem ser benéficas no contexto da regeneração do osso, auxiliando na modulação da resposta imunológica e promovendo um ambiente mais propício à cicatrização. A nanotecnologia permite manipular de forma precisa as propriedades dos materiais, possibilitando ajustes nas características físico-químicas dos filmes. Dessa forma, é possível otimizar a libertação controlada de iões de prata, maximizando os seus benefícios terapêuticos sem comprometer a biocompatibilidade. Contudo, é fundamental realizar estudos que avaliem a biocompatibilidade e a segurança da incorporação de nanopartículas de prata nos filmes, considerando tanto as interações com células ósseas, quanto possíveis efeitos sistémicos. Além disso, devem ser realizados ensaios que avaliem o potencial osteogénico e a influência na matriz extracelular para averiguar que a adição de nanopartículas de prata não compromete as propriedades regenerativas dos filmes.

Adicionalmente, é essencial conduzir uma análise mais aprofundada, em ambiente *in vitro*, sobre a interação dos filmes desenvolvidos com células específicas, nomeadamente osteoblastos, com vista a realizar uma análise mais representativa. Ao repetir os ensaios com osteoblastos, será possível verificar se as células não tumorais mamárias realmente não manifestam afinidade com o HA. De facto, os osteoblastos, por serem células específicas do osso e fazerem parte da sua composição, podem demonstrar melhores resultados na regeneração óssea com a adição de HA.

Em suma, as perspetivas futuras para esta área de estudo são bastante vastas, oferecendo oportunidades para contribuições no campo da regeneração óssea e, por conseguinte, na melhoria da qualidade de vida de doentes com condições ortopédicas e traumáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arboleya, L., & Castañeda, S. (2013). Osteoimmunology: The Study of the Relationship Between the Immune System and Bone Tissue. *Reumatología Clínica (English Edition)*, 9(5), 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.reumae.2013.02.004>
- Asti, A., & Gioglio, L. (2014). Natural and Synthetic Biodegradable Polymers: Different Scaffolds for Cell Expansion and Tissue Formation. *The International Journal of Artificial Organs*, 37(3), 187–205.
- Astur, D. C., Zanatta, F., Arliani, G. G., Moraes, E. R., Pochini, A. de C., & Ejnisman, B. (2016). Stress fractures: definition, diagnosis and treatment. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*, 51(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.rboe.2015.12.008>
- Bădilă, A. E., Rădulescu, D. M., Niculescu, A. G., Grumezescu, A. M., Rădulescu, M., & Rădulescu, A. R. (2021). Recent advances in the treatment of bone metastases and primary bone tumors: An up-to-date review. *Cancers*, 13(16), 1–38. <https://doi.org/10.3390/cancers13164229>
- Baek, W., & Kim, J. (2011). *Transcriptional regulation of bone formation*. 126–135.
- Barbut, S., & Harper, B. A. (2019). Dried Ca-alginate films: Effects of glycerol, relative humidity, soy fibers, and carrageenan. *Lwt*, 103(January), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.004>
- Bigham-Sadegh, A., & Oryan, A. (2015). Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. *International Wound Journal*, 12(3), 238–247. <https://doi.org/10.1111/iwj.12231>
- Boskey, A. L. (1989). Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone and Mineral*, 6(2), 111–123.
- Boskey, A. L., & Posner, A. S. (1984). Bone structure, composition, and mineralization. *Orthopedic Clinics of North America*, 15(4), 597–612.
- Buckwalter, J., & Cooper, R. (1987). Bone structure and function. *Instructional Course Lectures*, 36, 27–48.
- Cao, W., Jin, J., Wu, G., Bravenboer, N., Helder, M. N., Pathak, J. L., Zandieh-Doulabi, B., Hogervorst, J. M. A., Matsukawa, S., Geonzon, L. C., Bacabac, R. G., Schulten, E. A. J. M., & Klein-Nulend, J. (2021). K-carrageenan stimulates pre-osteoblast proliferation and osteogenic differentiation: A potential factor for the promotion of bone regeneration? *Molecules*, 26(20), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules26206131>
- Caridade, S. G., & Mano, J. F. (2017). Engineering membranes for bone regeneration. *Tissue Engineering - Part A*, 23(23–24), 1502–1533. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0094>
- Carlos, L., Porto, G. G., Sávio, E., & Andrade, D. S. (2018). *Demineralized bone matrix and calcium-phosphate cement in bone regeneration in rats*. 29768538. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180040000007>
- Carvalho, M. S., Cabral, J. M., Silva, C. L., & Vashishth, D. (2021). *Bone Matrix Non-Collagenous Proteins in Tissue Engineering: Creating New Bone by Mimicking the Extracellular Matrix*. <https://doi.org/10.3390/polym13071095>

- Clark, D., Nakamura, M., Miclau, T., & Marcucio, R. (2017). Effects of Aging on Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports*, 15(6), 601–608. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0413-9>
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3 Suppl 3, 1–17. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Daniel, R., Zeilinger, A., Schöberl, T., Sartory, B., Mitterer, C., & Keckes, J. (2015). Microstructure-controlled depth gradients of mechanical properties in thin nanocrystalline films: Towards structure-property gradient functionalization. *Journal of Applied Physics*, 117(23), 1–6. <https://doi.org/10.1063/1.4922666>
- Dempster, D. W. (1997). Exploiting and bypassing the bone remodeling cycle to optimize the treatment of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(8), 1152–1154. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.8.1152>
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9, 1–43. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>
- Eriksen, E. F. (1986). Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: Three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocrine Reviews*, 7(4), 379–408. <https://doi.org/10.1210/edrv-7-4-379>
- Eriksen, E. F., Axelrod, D. W., & Melsen, F. (1993). Bone Histomorphometry. In *Raven Press*.
- Fazzalari, N. L. (2011). Bone Fracture and bone fracture repair. *Osteoporosis International*, 22(6), 2003–2006. <https://doi.org/10.1007/s00198-011-1611-4>
- Feng, X. (2009). Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Current Chemical Biology*, 3(2), 189–196. <https://doi.org/10.2174/187231309788166398>
- Fesseha, H., & Fesseha, Y. (2020). Bone Grafting, Its Principle and Application: A Review. *Osteol Rheumatol Open J*, 1(1), 43–50. <https://doi.org/10.17140/ORHOJ-1-113>
- Francillon-Vieillot, H., V. de Buffrénil, Castanet, J., J. Géraudie, F. ., Meunier, F. J., J.Y. Sire, L. Zylberberg, & A.J. de Ricqlès. (1990). Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissues. Chapter 20. *Van Nostrand Reinhold, New York*, 1, 471–530.
- Franz-Odendaal, T. A., Hall, B. K., & Witten, P. E. (2006). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics*, 235(1), 176–190. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603>
- Goswami, R. (2016). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. *Indian Journal of Medical Research*, 144(3), 489. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.198664>
- Habibovic, P., Van Der Valk, C. M., Van Blitterswijk, C. A., De Groot, K., & Meijer, G. (2004). Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(4), 373–380. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000021104.42685.9f>
- He, L. H., Standard, O. C., Huang, T. T. Y., Latella, B. A., & Swain, M. V. (2008). Mechanical behaviour of porous hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 577–586. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.002>

- Henkel, J., Woodruff, M. A., Epari, D. R., Steck, R., Glatt, V., Dickinson, I. C., Choong, P. F. M., Schuetz, M. A., & Hutmacher, D. W. (2013). Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions-A 21st Century Perspective. *Bone Research*, 1, 216–248. <https://doi.org/10.4248/BR201303002>
- Kattimani, V. S., Kondaka, S., & Lingamaneni, K. P. (2016). Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *SAGE Journals*, 7, 9–19. <https://doi.org/10.4137/BTRI.S36138>
- Khan, S. N., MD, F. P. C., Jr, MD, H. S. S., MD, A. D. D., MD, PhD, F. P. G., & Joseph M. Lane, M. (2005). The Biology of Bone Grafting. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 58(8), 1–86. <https://doi.org/10.5435/00124635-200501000-00010>
- Khurana, J. S. (2009). *Bone Pathology* (second). Human Press.
- Kim, K. H., Jeong, L., Park, H. N., Shin, S. Y., Park, W. H., Lee, S. C., Kim, T. Il, Park, Y. J., Seol, Y. J., Lee, Y. M., Ku, Y., Rhyu, I. C., Han, S. B., & Chung, C. P. (2005). Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *Journal of Biotechnology*, 120(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.033>
- Kim, T., Wang, C., Li, X., & Zhu, D. (2020). Orthopedic implants and devices for bone fractures and defects : Past , present and perspective. *Engineered Regeneration*, 1(May), 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.05.003>
- Korhonen, R. K., & Saarakkala, S. (2011). Biomechanics and Modeling of Skeletal Soft Tissues. In *Theoretical Biomechanics* (Issue 6). <https://doi.org/10.5772/19975>
- Langdahl, B., Ferrari, S., & Dempster, D. W. (2016). Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 8(6), 225–235. <https://doi.org/10.1177/1759720X16670154>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Laurencin, C., Khan, Y., & El-Amin, S. F. (2006). Bone graft substitutes. *Expert Review of Medical Devices*, 3(1), 49–57. <https://doi.org/10.1586/17434440.3.1.49>
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- LeGeros, R. Z., & LeGeros, J. P. (1993). Dense Hydroxyapatite, in an Introduction to Bioceramics. *World Scientific Publishing Co*, 139–180.
- Lin, X., Patil, S., Gao, Y. G., & Qian, A. (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1–28. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>
- Liu, X., Lim, J. Y., Donahue, H. J., Dhurjati, R., Mastro, A. M., & Vogler, E. A. (2007). Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro. *Biomaterials*, 28(31), 4535–4550. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.016>
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 21(2), 115–137. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395>

- Marcus, R., Feldman, D., A. Nelson, D., & J. Rosen, C. (2007). *Osteoporosis*. Academic Press.
- Marie, P. J., & Kassem, M. (2011). Osteoblasts in osteoporosis: Past, emerging, and future anabolic targets. *European Journal of Endocrinology*, 165(1), 1–10. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0132>
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>
- Mashahdi, N. I., & Idris, M. I. (2021). *Fabrication of Alginate and Hydroxyapatite Biocomposite Film for Tissue Regeneration Application*. 2(2), 371–379.
- Menzies's, K. L., & Jones, L. W. (2010). *The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials* (Vol. 87, Issue 6). Journal of the American Academy of optometry. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e>
- Oun, A. A., & Rhim, J. W. (2017). Carrageenan-based hydrogels and films: Effect of ZnO and CuO nanoparticles on the physical, mechanical, and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 67(June), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.040>
- Paşcalau, V., Popescu, V., Popescu, G. L., Dudescu, M. C., Borodi, G., Dinescu, A., Perhaița, I., & Paul, M. (2012). The alginate/k-carrageenan ratio's influence on the properties of the cross-linked composite films. *Journal of Alloys and Compounds*, 536(SUPPL.1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2011.12.026>
- Pereira, R., Mendes, A., & Bártolo, P. (2013). Alginate/Aloe vera hydrogel films for biomedical applications. *Procedia CIRP*, 5, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2013.01.042>
- Ripamonti, U., Roden, L. C., & Renton, L. F. (2012). Osteoinductive hydroxyapatite-coated titanium implants. *Biomaterials*, 33(15), 3813–3823. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.050>
- Roberts, T. T., & Rosenbaum, A. J. (2012). Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis*, 8(4), 114–124. <https://doi.org/10.4161/org.23306>
- Rubin, C. T., & Lanyon, L. E. (1987). Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: Function as a determinant for adaptive remodeling in bone. *Journal of Orthopaedic Research*, 5(2), 300–310. <https://doi.org/10.1002/jor.1100050217>
- Samuel, S. P., Baran, G. R., Wei, Y., & Davis, B. L. (2009). Biomechanics - Part II. In Bone Pathology. In *Humana Press: Totowa, NJ*.
- Schemitsch, E. H. (2017). Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *Journal of Orthopaedic Trauma*, 31, S20–S22. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000000978>
- Sela, J., & Bab, I. (2012). *Principles of Bone Regeneration* (Vol. 30, Issue 13). Springer US: Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2059-0>
- Sheen, J. R., Mabrouk, A., & Garla, V. V. (2023). *Fracture Healing Overview*. 1–8.
- Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hauser, J., & Ring, A. (2022). Improving Vascularization of Biomaterials for Skin and Bone Regeneration by Surface Modification: A Narrative Review on Experimental Research. *Bioengineering*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9070298>

- Squier, C. A., Ghoneim, S., & Kremenak, C. R. (1990). Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *Journal of Anatomy*, 171, 233–239.
- Sroga, G. E., Karim, L., Colón, W., & Vashishth, D. (2011). Biochemical characterization of major bone-matrix proteins using nanoscale-size bone samples and proteomics methodology. *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(9), 1–2. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.006718>
- Stevens, B., Yang, Y., Mohandas, A., Stucker, B., & Nguyen, K. T. (2008). A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 85(2), 573–582. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30962>
- Tang, S. . (2017). *Natural composites: The structure-function relationships of bone, cartilage, tendon/ligament, and the intervertebral disc. In Biomedical Composites.*
- Tiemann, A. H., & Hofmann, G. O. (2009). Principles of the therapy of bone infections in adult extremities: Are there any new developments? *Strategies in Trauma and Limb Reconstruction*, 4(2), 57–64. <https://doi.org/10.1007/s11751-009-0059-y>
- Uddströmer, L. (1978). The osteogenic capacity of tubular and membranous bone periosteum: A qualitative and quantitative experimental study in growing rabbits. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, 12(3), 195–205. <https://doi.org/10.3109/02844317809012995>
- Zhu, X., Chan, Y. T., Yung, P. S. H., Tuan, R. S., & Jiang, Y. (2021). Subchondral Bone Remodeling: A Therapeutic Target for Osteoarthritis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(January). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.607764>