

ABSTRACT

Biomaterials are all kinds of materials that interact with biological systems to treat, strengthen or replace tissue, an organ or a body function. There has been an ever increasing need for new biomaterials, products and surgical techniques. Some of the main motivations behind the development of new synthetic biomaterials include:

- The growth of life expectancy, resulting in increased incidence of degenerative diseases such as osteoporosis;
- Excessively sedentary lifestyles resulting in degenerative osteoarthritis;
- Increased participation in sports causing serious trauma injuries;
- The refusal of the public to tolerate the slightest limitations in mobility;
- Increasing awareness among patients and doctors of the numerous co-morbidities associated with autograft harvesting;
- The elevated regulatory scrutiny and recalls imposed on allograft tissue banks for distributing human bone and soft tissue products that were improperly screened for infectious diseases.

Bone is a live tissue with a macroporous structure consisting of a hybrid organic-inorganic matrix constituted mainly by inorganic calcium phosphates (~70%), and organic components (~30%) that include collagen fibres, marrow cells and osseous cells. The inorganic part is composed of carbonated calcium deficient hydroxyapatite, often represented by a biphasic mixture of stoichiometric hydroxyapatite [HA, $\text{Ca}_5[(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$] and β -tricalciumphosphate [β -TCP, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]. Moreover, biological apatites contain trace elements that play essential roles in bone metabolism.

The actual trend towards shifting away from autografts to bone graft substitutes, and from cadaver allografts to synthetics faces the big challenge of mimicking the living tissue from the mechanical, chemical, biological and functional points of view. This challenge has been undertaken in the present work. Accordingly, co-substituted biphasic calcium phosphates (BCP) comprising biological like HA (BL-HA - mixtures of HA and β -TCP doped with some essential trace elements found in the biological apatite) were given preference as the inorganic part of the developed synthetic bone substitutes, in detriment of pure single-phase HA or β -TCP components, while biopolymers, including polylactic acid (PLA), polyglycolic acid (PGA), or their co-polymers (PLGA) were thought as potential substitutes for the organic part of the bone.

The overall work carried out comprised the preparation and full characterisation of calcium phosphate powders with different compositions, the preparation of high concentrated suspensions from the powders that were used to prepare dense bodies, porous parts granular materials, porous scaffolds resembling the cortical, the trabecular, or the complete bone structure via traditional and emerging consolidation techniques. Silane-coupling agents were used to efficiently bond the inorganic and organic phases through an electrostatic/chemical interaction and to obtain hybrid composite scaffolds with controlled porous structures aiming at obtaining synthetic substitutes for bone regeneration and systems for local controlled delivery of therapeutic molecules.

Sintered inorganic specimens and the hybrid composite scaffolds were characterised for their physical properties (mechanical strength, porosity fraction, pore sizes). The ability of BL-HA and of the BL-HA/PLGA hybrid materials to mineralise was investigated in simulated body fluids (SBF). It was observed that the immersion of these materials in SBF easily induced the formation of an apatitic carbonate layer on its surface. The *in vitro* biocompatibility of these synthetic substitutes evaluated in cultured osteoblastic cells, in terms of cytotoxicity and cell proliferation revealed that BL-HA and BL-HA/PLGA hybrid materials are cytocompatible, promoting proliferation of osteoblastic cells, conferring them a good potential for bone regeneration and maxillofacial applications.

RESUMO

Biomateriais são todos os tipos de materiais capazes de interagir com sistemas biológicos para tratar, fortalecer ou substituir um tecido, um órgão ou uma função corporal. A necessidade de novos biomateriais, produtos e técnicas cirúrgicas tem vindo a crescer de forma contínua. Algumas das motivações para o desenvolvimento de novos biomateriais sintéticos incluem:

- O crescimento da esperança média de vida, resultando no crescimento da incidência de doenças degenerativas como a osteoporose;
- O sedentarismo, resultando em osteoartrite degenerativa;
- Participação crescente em desportos causando ferimentos traumáticos;
- A recusa do público para tolerar mesmo ligeiras limitações na sua mobilidade;
- O maior nível de consciencialização por parte dos pacientes e dos médicos acerca da morbidez associada à recolha de auto enxertos;
- O escrutínio cada vez mais exigente, e as retomas impostas de enxertos de cadáver que não tenham sido adequadamente controlados relativamente a doenças infecciosas.

O osso é um tecido vivo com uma estrutura macroporosa consistindo de uma matriz híbrida orgânica-inorgânica constituída principalmente por fosfatos de cálcio (~70%) e componentes orgânicos (~30%) que incluem fibras de colagénio, células da medula e células ósseas. A parte inorgânica é composta por hidroxiapatite carbonatada deficiente em cálcio, muitas vezes representada por uma mistura bifásica de hidroxiapatite estequiométrica [HA, $\text{Ca}_5[(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$] e β -fosfato tricálcico [β -TCP, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]. Além disso, as apatites biológicas contêm elementos vestigiais que desempenham um papel essencial no metabolismo do osso. A tendência actual de substituir os auto enxertos por enxertos ósseos, e os enxertos de cadáver por materiais sintéticos, depara-se com o grande desafio de imitar o tecido vivo do ponto de vista mecânico, químico, biológico e funcional. Foi este desafio que motivou o presente trabalho. Neste sentido, deu-se preferência a fosfatos de cálcio bifásicos co-substituídos (BCP) com composição próxima da HA biológica (BL-HA – misturas de HA e β -TCP dopadas com os principais elementos vestigiais encontrados nas apatites biológicas) como a parte inorgânica, em detrimento da HA ou β -TCP puros, enquanto biopolímeros como o ácido

poliláctico (PLA), o ácido poliglicólico (PGA) ou os seus copolímeros (PLGA), foram usados como potenciais substitutos da parte orgânica do osso.

O trabalho realizado incluiu a preparação e a caracterização completa de pós de fosfato de cálcio com composições diferentes, a preparação de suspensões muito concentradas para a consolidação de corpos densos, porosos, materiais granulares, enxertos com estrutura porosas semelhantes às partes cortical, trabecular, ou à constituição completa do osso através de técnicas de consolidação tradicionais e emergentes. Agentes do tipo silano foram usados para acoplar de forma efectiva as fases inorgânicas e orgânicas através de interacções electrostáticas/químicas e para obter enxertos sintéticos compósitos híbridos de porosidade controlada para aplicações em cirurgias de substituição e regeneração do osso em sistemas de libertação controlada de drogas.

Determinaram-se as propriedades físicas (resistência mecânica, fracção de porosidade, tamanho de poro) dos materiais inorgânicos sinterizados e dos enxertos compósitos híbridos. A capacidade de mineralização da BL-HA dos materiais híbridos BL-HA/PLGA foi testada em fluído fisiológico simulado (SBF). A imersão em SBF induziu a formação rápida de uma camada superficial de apatite carbonatada. Os testes de biocompatibilidade *in vitro* em culturas de osteoblastos em termos de citotoxicidade e proliferação de células revelaram que a BL-HA e os materiais híbridos BL-HA/PLGA são citocompatíveis, promovendo a proliferação das células osteoblásticas, conferindo-lhes um bom potencial para aplicações em regeneração óssea e maxilofacial.