



M 2019



DESENVOLVIMENTO DE ESFERAS CERÂMICAS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

JOANA DINIS COUTO REIS

DISSERTAÇÃO REALIZADA NO ÂMBITO DO MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA
METALÚRGICA E DE MATERIAIS

MARIA ASCENSÃO LOPES

ORIENTADORA

PROFESSORA DOUTORA NO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
METALÚRGICA E DE MATERIAIS

CANDIDATO	JOANA DINIS COUTO REIS	CÓDIGO	201403665
TÍTULO	DESENVOLVIMENTO DE ESFERAS CERÂMICAS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA		
DATA	3 DE SETEMBRO DE 2019		
LOCAL	F106 - DEMM - FEUP		
JÚRI			
PRESIDENTE	FERNANDO JORGE MENDES MONTEIRO	DEMM - FEUP	
ARGUENTE	MARIA PIA DE MELO ALVIM FERRAZ	UFP	
ORIENTADOR	MARIA ASCENSÃO FERREIRA SILVA LOPES	DEMM - FEUP	

Resumo

A principal função do osso é a manutenção estrutural do organismo. No entanto, sendo um componente frágil, a ocorrência de defeitos ósseos é muito comum, podendo estar associada a diversos motivos incluindo: distúrbios congénitos, infeções, tumores, fraturas, entre outros. Desta forma, têm vindo a ser desenvolvidos substitutos ósseos sintéticos de forma a auxiliar o processo regenerativo do osso.

Este projeto de dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de um substituto ósseo sintético, sob a forma de esferas de hidroxiapatite com uma estrutura macroporosa e interconetiva.

Este trabalho engloba, numa primeira etapa, uma revisão bibliográfica que tem como objetivo o enquadramento teórico. Nesse capítulo, foram abordados alguns conceitos teóricos acerca do osso, dos biocerâmicos, dos fosfatos de cálcio, entre outros. Adicionalmente, foi abordada a técnica utilizada, ao longo do trabalho prático, para obtenção de estruturas porosas cerâmicas, nomeadamente, a metodologia de formação de espumas utilizando-se surfactantes.

Relativamente à componente experimental, começou-se por realizar um estudo acerca das propriedades das espumas, visto que estas são o ponto de partida para obtenção das estruturas porosas. As propriedades das espumas estudadas, foram a espumabilidade (capacidade de formação de espuma) e a estabilidade da espuma (tempo de vida da espuma). Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar o efeito da metodologia de agitação, do tipo de surfactante e da sua concentração, e da adição de um estabilizador de espuma nas propriedades das espumas. Para tal, foram selecionados dois surfactantes usualmente utilizados em aplicações biomédicas (*Pluronic F127* e *Tween80*), e produzidas soluções de ambos nas concentrações de 1, 4, 10 e 15 % (m/v). As metodologias de agitação utilizadas foram a técnica *syringe-foaming* e o uso de um instrumento de agitação elétrico. Adicionalmente, o agente estabilizador de espuma utilizado foi um hidrogel, à base de alginato.

Com base nos resultados das propriedades das espumas obtidos, selecionou-se um conjunto de formulações para se proceder à produção das esferas cerâmicas. A produção das esferas é realizada através de uma espuma líquida cerâmica, que consiste na mistura da espuma obtida através da solução de surfactante com uma suspensão cerâmica (suspensão de pó de hidroxiapatite em alginato). Posteriormente, essa espuma líquida cerâmica é coletada numa seringa e injetada a uma velocidade controlada através de uma peça de secção circular para uma solução de cloreto de cálcio, que assume a reticulação do alginato e, desta forma, a manutenção da forma esférica das esferas. Após tratamento térmico, as esferas produzidas foram analisadas e caracterizadas a nível de cristalinidade e fases

cristalinas presentes, de porosidade e de resistência ao esmagamento, sendo que esta caracterização permitiu determinar a formulação ideal que oferece uma melhor relação entre propriedades.

Face aos resultados obtidos, concluiu-se que em ambos os surfactantes o alginato tem um efeito estabilizador nas espumas, garantindo uma manutenção do volume das espumas por intervalos de tempo maiores e conferindo, conseqüentemente, níveis de porosidade mais satisfatórios. Por sua vez, a metodologia de agitação que se demonstrou mais eficiente atendendo ao objetivo do trabalho, foi o uso do instrumento de agitação elétrico. Por fim, a nível de qualidade da espuma os melhores resultados foram para o surfactante *Pluronic F127*, contudo, as esferas que possuem uma melhor relação entre propriedades físicas e mecânicas foram as obtidas a partir do *Tween80*.

Palavras-chave

Regeneração Óssea; Substituto Ósseo; Esferas; Hidroxiapatite; Porosidade; Espumas; Surfactante; *Pluronic F127*; *Tween80*; Resistência ao Esmagamento

Abstract

The main function of bone is the structural maintenance of the body. However, being a fragile component, the occurrence of bone defects is very common and may be associated with several reasons including: congenital disorders, infections, tumors, fractures, among others. Thus, synthetic bone substitutes have been developed to assist the bone regenerative process.

This dissertation project aimed to develop a synthetic bone substitute in the form of hydroxyapatite spheres with a macroporous and interconnected structure.

This work includes, in a first stage, a bibliographic review. In this chapter, some theoretical concepts about bone, bioceramics, calcium phosphates, among others, were addressed. In addition, the technique used throughout the practical work to obtain ceramic porous structures was approached, namely the surfactant foaming methodology.

Regarding the experimental component, the study was started by the analysis of the foams properties, as these are the starting point for obtaining the porous structures. The foam properties studied were foamability (foaming capacity) and foam stability (foam lifetime). This study was carried out to determine the effect of the stirring methodology, the type of surfactant, its concentration and the addition of a foam stabilizer on the foam properties. For this, two surfactants commonly used in biomedical applications (*Pluronic F127* and *Tween80*) were selected, and solutions of both were produced at concentrations of 1, 4, 10 and 15% (m/v). The agitation methodologies used were the syringe-foaming technique and the use of an electric instrument. Additionally, the foam stabilizing agent used was a hydrogel, namely alginate.

Then, depending on the results of the obtained foam properties, a set of formulations optimized to produce the ceramic spheres was selected. The production of the spheres is carried out by means of a ceramic liquid foam, which consists in mixing the foam obtained from the surfactant solution with a ceramic mixture which corresponds to a paste of hydroxyapatite powder with alginate. Subsequently, this ceramic liquid foam is collected in a syringe and injected at a controlled rate through a circular section piece into a calcium chloride solution. The calcium chloride solution will be responsible for the crosslinking of the alginate and thus maintaining the spherical shape of the spheres. After heat treatment, the produced spheres were analyzed and characterized in terms of crystallinity, porosity and crush strength. This characterization allowed to determine the ideal formulation that offers a better relationship between properties.

According to the results obtained, it was concluded that for both surfactants alginate has a foam stabilizing effect, ensuring a maintenance of the foam volume

over longer periods of time and thus conferring more satisfactory porosity levels. In turn, the agitation methodology that proved to be the most efficient, according to the objective of the work, was the use of the electric instrument. Finally, in terms of foam quality the best results were for *Pluronic F127*, however, the spheres that have a better relationship between physical and mechanical properties were obtained from *Tween80*.

Key-words

Bone regeneration; Bone Substitute; Spheres; Hydroxyapatite; Porosity; Foams; Surfactant; *Pluronic F127*; *Tween80*; Crush Resistance

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho marca o fim da etapa mais marcante e determinante da minha vida. Contudo, isto não seria possível sem o acompanhamento, apoio e estímulo de todas as pessoas que fizeram parte desta jornada. Gostaria, por esse facto, de expressar toda a minha gratidão e apreço pelo seu contributo indispensável nesta conquista.

Assim sendo, gostaria de direccionar o meu primeiro agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Maria Ascensão Lopes pelo acompanhamento, disponibilidade, dedicação incansável e por todo o conhecimento transmitido. Obrigada pela orientação excepcional.

A todos os professores do Departamento de Metalurgia e Materiais, pelo seu acompanhamento e contributo indispensável para a minha formação académica e desenvolvimento pessoal.

Às minhas meninas do laboratório F201 por todos os momentos de alegria e diversão, por todas as conversas, entreaajuda e partilha.

Aos meus amigos que me acompanham há cinco anos, em especial à minha querida Ana. Obrigada por fazerem destes cinco anos os melhores da minha vida. Obrigada por todos os momentos partilhados, por todo apoio, brincadeiras e risadas, e essencialmente obrigada pela vossa eterna amizade.

Aos meus amigos que me acompanham não há cinco, mas há oito anos, Rena, Marta, Diogo, Rita, Pires e Leonor. Obrigada por todo carinho, apoio e amizade. Obrigada por fazerem parte da minha vida e por estarem sempre presentes.

À minha alma gémea e melhor amigo, ao meu querido Adriano Vilarinho, obrigada por todo amor, carinho, paciência, conselhos, preocupação, apoio e pela presença incansável em todos os momentos bons e maus. Sem ti não seria possível.

À minha família, em especial à minha *Mamy* e à minha *one and only sis Clarinha*, que sempre proporcionaram a minha tranquilidade e conforto, e sempre foram uma fonte de exemplo de persistência e trabalho. Obrigada por todo amor, pelo esforço e dedicação, preocupação e carinho, apoio incondicional e compreensão. Obrigada por me tornarem naquilo que sou hoje.

A todos o meu eterno e humilde agradecimento.

Índice

Resumo.....	iii
Palavras-chave.....	iv
Abstract.....	v
Key-words	vi
Lista de Figuras.....	xi
Abreviaturas e Símbolos	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Objetivo.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Tecido Ósseo	3
2.1.1. Função.....	3
2.1.2. Matriz Óssea	3
2.1.3. Estrutura Óssea	5
2.1.4. Células Ósseas.....	7
2.1.4.1. Osteoblastos	7
2.1.4.2. Osteócitos.....	7
2.1.4.3. Osteoclastos	8
2.1.5. Remodelação Óssea	8
2.1.6. Propriedades Mecânicas do Osso	9
2.2. Substitutos Ósseos	10
2.2.1. Propriedades Biológicas.....	10
2.2.2. Classificação.....	11
2.2.3. Materiais Sintéticos.....	12
2.2.3.1. Biocerâmicos	12
2.2.4. Porosidade	14
2.2.4.1. Técnica de formação de espuma	15
2.2.4.1.1. Surfactante <i>Pluronic F127</i>	17
2.2.4.1.2. Surfactante <i>Tween80</i>	19
3. Procedimento Experimental	20
3.1. Matérias-Primas	20

3.2.	Caracterização das Matérias-Primas	20
3.2.1.	Análise Granulométrica	20
3.3.	Estudo da Espumabilidade e da Estabilidade da Espuma	20
3.4.	Formulações das Espumas Líquidas Cerâmicas	22
3.5.	Produção das Esferas.....	23
3.6.	Caracterização das Esferas.....	24
3.6.1.	Análise de Fases Cristalinas	24
3.6.2.	Análise Morfológica/Topográfica	24
3.6.3.	Determinação da Densidade	25
3.6.4.	Determinação do Teor de Porosidade	25
3.6.5.	Propriedades Mecânicas	26
4.	Apresentação e Discussão de Resultados.....	27
4.1.	Caracterização das Matérias-Primas	27
4.1.1.	Análise Granulométrica	27
4.2.	Estudo da Espumabilidade e Estabilidade da espuma	27
4.2.1.	Propriedades das Espumas da Solução de Surfactante	28
4.2.1.1.	Espumabilidade	29
4.2.1.1.1.	Metodologia via <i>Syringe-Foaming</i>	29
4.2.1.1.2.	Metodologia via Instrumento Elétrico	30
4.2.1.1.3.	Tamanho das Bolhas na formação da Espuma	31
4.2.1.2.	Estabilidade da Espuma	32
4.2.2.	Propriedades da Espuma Líquida Cerâmica.....	38
4.2.2.1.	Estabilidade da Espuma.....	38
4.3.	Produção das Esferas.....	39
4.4.	Caracterização das Esferas.....	41
4.4.1.	Análise de Fases Cristalinas	41
4.4.2.	Efeito do Surfactante e do Agente Estabilizador de Espuma na Porosidade das Esferas.....	42
4.4.3.	Efeito da Viscosidade da Espuma Líquida Cerâmica na Forma das Esferas	46
4.4.4.	Propriedades das Esferas	47
4.4.4.1.	Determinação da Densidade.....	47
4.4.4.2.	Teor de Porosidade e Resistência ao Esmagamento	47
5.	Conclusão.....	50

6. Trabalhos Futuros	52
Referências Bibliográficas	53

Lista de Figuras

Figura 1: Composição da matriz óssea (adaptado de [22]).	4
Figura 2: Foto macroscópica de uma seção espessa do osso demonstrando o osso cortical e trabecular no interior do osso (adaptado de [14]).	5
Figura 3: Visão geral esquemática dos componentes principais do osso (adaptado de [14]).	6
Figura 4: Processo de mineralização da matriz óssea (adaptado de [14]).	7
Figura 5: Desenvolvimento de um osteão aquando a remodelação óssea (adaptado de [14]).	9
Figura 6: Etapas de reparação de uma fratura óssea (adaptado de [14]).	9
Figura 7: Classificação e propriedades dos fosfatos de cálcio (adaptado de [22]).	13
Figura 8: Estrutura simplificada de um surfactante (adaptado de [57]).	16
Figura 9: Esquematização da fronteira de <i>Plateau</i> na espuma de um surfactante (adaptado de [64]).	17
Figura 10: Representação esquemática da constituição do surfactante Pluronic F127 (adaptado de [59]).	18
Figura 11: Representação do surfactante <i>Tween80</i> (adaptado de [70]).	19
Figura 12: Esquema do processo de formação de espumas através da metodologia <i>syringe-foaming</i> (adaptado de [74]).	21
Figura 13: Esquematização das duas etapas de formação de espumas envolvidas na produção de esferas cerâmicas. *Nota: O Alginato pode ou não ser introduzido para a produção da espuma da solução de surfactante.	21
Figura 14: Sistema utilizado para a produção de esferas cerâmicas.	23
Figura 15: Tratamento térmico utilizado para a combustão da matéria orgânica e sinterização do material cerâmico.	24
Figura 16: Equipamento utilizado para realizar as medições para determinação da densidade de Arquimedes.	25
Figura 17: Histograma da distribuição do tamanho de partícula (μm) do pó de HAp utilizado.	27
Figura 18: Resultados do estudo da espumabilidade de ambos os surfactantes utilizados, recorrendo-se à metodologia de agitação via <i>syringe-foaming</i> .	29
Figura 19: Resultados do estudo de espumabilidade de ambos os surfactantes utilizados, recorrendo-se à metodologia de agitação via uso de um instrumento de agitação elétrico.	31
Figura 20: Tamanho de bolhas das espumas imediatamente após a sua produção. a) e b) espumas obtidas a partir da metodologia de agitação via <i>syringe-foaming</i> ; c) e d) espumas obtidas a partir da metodologia de agitação via uso de um instrumento de agitação elétrico.	32
Figura 21: Resultados de estabilidade da espuma obtidos para o surfactante <i>Pluronic F127</i> e recorrendo-se à metodologia de agitação via <i>syringe-foaming</i> .	33
Figura 22: Resultados de estabilidade da espuma obtidos para o surfactante <i>Pluronic F127</i> recorrendo-se a um instrumento de agitação elétrico.	34

Figura 23: Resultados de estabilidade da espuma obtidos para o surfactante <i>Tween80</i> e recorrendo-se à metodologia de agitação via <i>syringe-foaming</i>	35
Figura 24: Resultados de estabilidade da espuma obtidos para o surfactante <i>Tween80</i> e recorrendo-se à metodologia de agitação via uso de um instrumento de agitação elétrico.	36
Figura 25: Resultados da espumabilidade das espumas líquidas cerâmicas.	39
Figura 26: Estrutura interna e externa das esferas obtidas através da produção de espumas a) via metodologia <i>syringe-foaming</i> e b) via uso de um instrumento de agitação elétrico.	40
Figura 27: Espectro DRX das esferas cerâmicas sinterizadas.	41
Figura 28: Micrografias das estruturas internas das esferas, referentes às amostras produzidas através da solução de concentração do surfactante <i>Pluronic F-127</i> de 10 % (m/v).	43
Figura 29: Micrografias MEV da estrutura interna das esferas, referentes às amostras produzidas a partir da solução de concentração do surfactante <i>Pluronic F-127</i> de 15 % (m/v).	43
Figura 30: Micrografias MEV da estrutura interna das esferas, referentes às amostras produzidas através da solução de concentração do surfactante <i>Tween80</i> de 10 % (m/v).	44
Figura 31: Imagens de esferas antes e após do processo de reticulação a) sem e b) com a adição de alginato à espuma como agente estabilizador.	46
Figura 32: Estruturas cerâmicas obtidas a) sem adição de etanol e b) com a adição de etanol à solução de cloreto de cálcio.	47

Lista de Tabelas

Tabela 1: Propriedades mecânicas e estruturais do osso cortical e trabecular (adaptado de [32]).	10
Tabela 2: Lista de alguns substitutos ósseos atualmente disponíveis no mercado. .	14
Tabela 3: Formulações utilizadas para produzir as esferas cerâmicas.	22
Tabela 4: Dados teóricos referentes aos valores de 2θ para as intensidades máximas para as diferentes fases cristalográficas.	42
Tabela 5: Resultados obtidos referentes ao teor de porosidade (aberta, fechada e total) e aos ensaios de resistência ao esmagamento.	49

Abreviaturas e Símbolos

As	Arsénio
Au	Ouro
BCP	Fosfato de Cálcio Bifásico
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
C	Carbono
CaPs	Fosfatos de Cálcio
CEMUP	Centro de Materiais da Universidade do Porto
CMC	Concentração Micelar Crítica
DRX	Difração de Raios-X
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Hap	Hidroxiapatite
MEV	Microscopia Eletrónica de Varrimento
P	Fósforo
Pd	Paládio
PEO	Molécula de Poli(oxietileno)
PF127	<i>Pluronic F127</i>
PPO	Molécula de Poli(oxipropileno)
S	Estrôncio
T80	<i>Tween80</i>
TCP	Fosfato de Tricálcio
V	Vanádio
<i>a</i>	alfa
<i>B</i>	beta
ρ	densidade
<i>A</i>	peso da amostra imersa
<i>ES</i>	espuma da solução de surfactante
<i>SC</i>	suspensão cerâmica
<i>P</i>	peso da amostra seca
<i>Pa</i>	porosidade aberta
<i>Re</i>	resistência ao esmagamento
<i>V_f</i>	volume imediatamente após a formação da espuma
<i>V_i</i>	volume inicial de surfactante

1. Introdução

1.1. Enquadramento

O osso é o único componente anatómico que exhibe condições fisiológicas suficientes para uma estabilização mecânica adequada, apresentando excelentes capacidades regenerativas. Contudo, o aumento da esperança média de vida, em conjunto com a crescente atividade desportiva com risco de trauma, levou ao incremento do aparecimento de defeitos ósseos e doenças ortopédicas [1, 2].

Para auxiliar a regeneração óssea e, conseqüentemente, recuperar a estabilidade estrutural do corpo humano, têm vindo a ser desenvolvidos substitutos ósseos. Um substituto ósseo pode ser definido como um material sintético ou natural usado para o tratamento de defeitos ósseos [3-6].

As vantagens dos enxertos ósseos sintéticos são a sua abundância e não possuírem risco de transferência de patologias e potencial antigenicidade. No entanto, estes materiais não possuem atividade osteogénica e osteoindutora [7-9].

Os biocerâmicos consistem numa grande classe de cerâmicos especialmente projetados para a reparação e reconstrução do osso. Dentro desta classe, os fosfatos de cálcio, por possuírem similaridade química com o osso, têm a capacidade de induzir respostas biológicas semelhantes ao osso, sendo, portanto, amplamente selecionados para aplicações biomédicas [3-6, 10, 11].

Uma das principais características a ter em consideração num material projetado para regeneração óssea é a sua porosidade. Substitutos ósseos com elevados níveis de porosidade apresentam uma elevada área superficial e, desta forma, mais locais suscetíveis a estabelecer ligação química com osso, garantindo uma boa fixação mecânica. Adicionalmente, uma completa interligação de poros fornece caminhos para a invasão de células, biofluidos e vasos sanguíneos. A vascularização óssea não só fornece nutrientes essenciais para a sobrevivência do tecido, mas também desempenha um papel crucial na coordenação da atividade das células ósseas e na sua migração para a remodelação óssea. Conseqüentemente, uma estrutura de poros interconectados favorece, geralmente, a regeneração de tecidos [12, 13].

Recentemente, tem vindo a ser estudada a obtenção de estruturas porosas cerâmicas através da formação de espumas recorrendo-se ao uso de um surfactante. Esta técnica destaca-se pela sua simplicidade, baixo custo e reprodutibilidade [14, 15].

1.2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de esferas porosas de hidroxiapatite, para aplicação na área de regeneração óssea. A forma esférica escolhida permitirá que o material forneça, para além da intraporosidade, uma interporosidade que promova a osteointegração a longo prazo. Pretende-se ainda atingir um equilíbrio entre a intraporosidade e a resistência ao esmagamento das esferas a desenvolver.

A intraporosidade será conseguida explorando uma abordagem que consiste em produzir, numa etapa inicial, uma espuma que é adicionada posteriormente a uma suspensão de hidroxiapatite, sendo as esferas produzidas por injeção através de uma bomba infusora.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Tecido Ósseo

O esqueleto consiste no sistema de suporte estrutural interno do ser humano. Por sua vez, apresenta mecanismos que lhe permitem crescer e sofrer alterações estruturais e dimensionais, de forma a adaptar-se aos vários estímulos externos, incluindo as forças mecânicas. A unidade básica do esqueleto é o osso que consiste em tecido conetivo composto por uma matriz orgânica, minerais inorgânicos, células e água [16].

O esqueleto humano adulto tem um total de 214 ossos, excluindo os ossos sesamóides. Cada osso, encontra-se em constante remodelação, de forma a permitir que corpo se adapte a mudanças nas forças biomecânicas. Desta forma, o processo de remodelação permite a renovação óssea, que consiste na substituição do osso mais envelhecido por osso recém formado, mecanicamente mais forte, garantindo uma preservação da resistência óssea [17, 18].

2.1.1. Função

Atendendo às suas propriedades e composição, o esqueleto humano cumpre uma panóplia de diversas funções. Os ossos que o constituem fornecem suporte estrutural para o resto do corpo, permitem o movimento e a locomoção, protegem os órgãos e estruturas internas vitais e fornecem alavancas para os músculos. Adicionalmente, o osso exerce uma função metabólica essencial, fornecendo manutenção da homeostase mineral e equilíbrio ácido-base, funcionando também como um reservatório de fatores de crescimento e citocinas [16, 17, 19].

2.1.2. Matriz Óssea

O osso é composto por água (10 %) e uma matriz orgânica (20 %) que é reforçada por depósitos de sais de cálcio (70 %). A matriz orgânica é constituída aproximadamente 95 % por colagénio, sendo que os restantes 5 % são compostos de proteoglicanos e numerosas proteínas não colagénicas. Os sais cristalinos depositados na matriz orgânica do osso são essencialmente cálcio e fosfato na forma apatítica (Figura 1) [18, 20, 21].

A apatite, é considerada a base estrutural para a fase mineral do osso, dentina e esmalte. Desta forma, a hidroxiapatite (HAp) sintética ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) é amplamente utilizada em medicina e odontologia devido à sua similaridade com a apatite biológica e às suas propriedades, entre elas a sua biocompatibilidade. Contudo, a estrutura da apatite biológica apresenta múltiplas substituições iónicas na sua constituição [22].

No ambiente fisiológico, a dissolução parcial dos fosfatos de cálcio (CaPs) ocorre no microambiente ácido causado pelas atividades celulares, levando ao aumento da supersaturação do líquido biológico ou fisiológico. Consequentemente, ocorre a precipitação da apatite juntamente com outros iões e moléculas orgânicas presentes no meio. Desta forma, a apatite biológica é uma estrutura de fosfato de cálcio incorporada

por vários tipos de iões. Cálcio, fósforo e oxigénio são os três principais elementos que compõem a estrutura da apatite [23, 24].

As variações composicionais da apatite ocorrem devido à sua capacidade de deter diferentes iões nas suas três sub-redes. Em detalhe, os iões de cálcio (Ca^{2+}) podem ser substituídos por catiões bivalentes ou monovalentes como estrôncio (Sr^{2+}), bário (Ba^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), sódio (Na^+) e potássio (K^+), enquanto que o fósforo (P) pode ser substituído por átomos como carbono (C), arsénio (As), vanádio (V), enxofre (S), por sua vez, o grupo hidroxila (OH^-) pode ser substituído por carbonato (CO_3^{2-}), fluor (F^-), cloro (Cl^-) ou mesmo estar livre [21, 23-25].

De salientar, que o seu conteúdo pode variar entre amostras e fontes, e a co-presença de todos esses elementos podem nem sempre ser detetados [23, 24].

A nível estrutural, o osso é organizado de forma a resistir às forças mecânicas aplicadas. A maioria dos cristais de apatite no osso apresentam um tamanho nanométrico. Quanto à sua forma, é caracterizada por apresentar uma forma em agulha com cerca de 20-50 nm de comprimento, aproximadamente 0-20 nm de largura e 2-4 nm de espessura. Os cristais de apatite são dispostos paralelamente às fibras de colagénio, sendo que essa orientação maximiza a resistência do colagénio às forças de tração e a resistência da apatite às forças de compressão [16, 26].

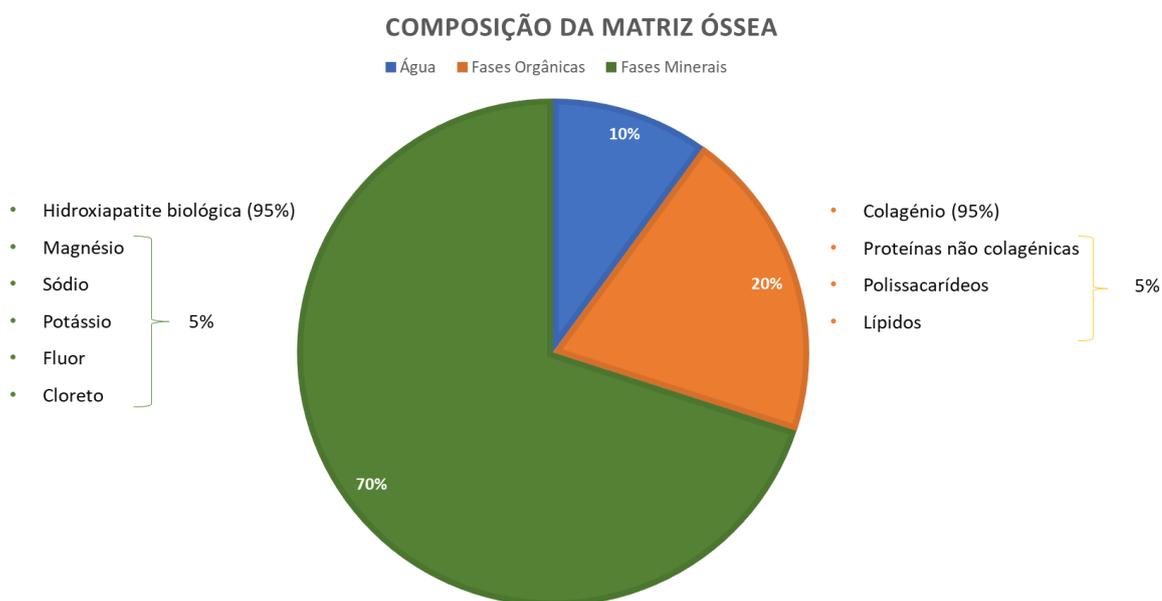


Figura 1: Composição da matriz óssea (adaptado de [22]).

2.1.3. Estrutura Óssea

Morfologicamente, existem duas formas de osso: cortical (compacto) e trabecular (esponjoso). O osso cortical forma uma camada externa densa, enquanto que o osso trabecular forma o núcleo interno poroso (Figura 2) [17].

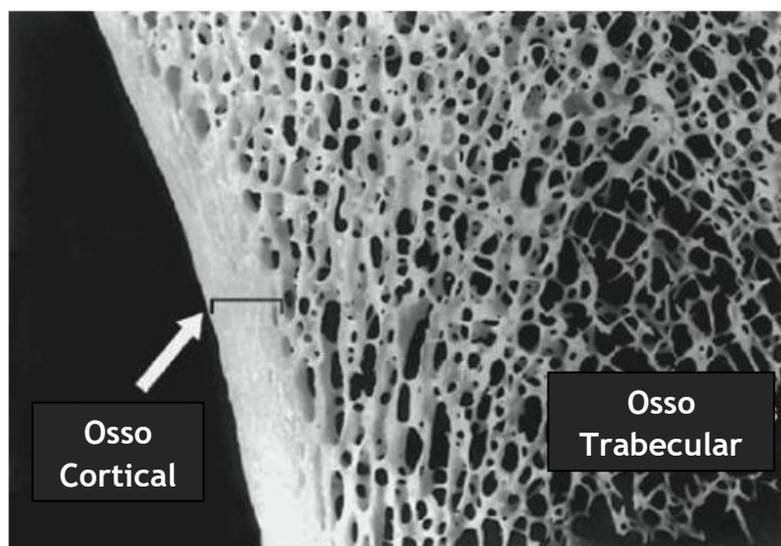


Figura 2: Foto macroscópica de uma seção espessa do osso demonstrando o osso cortical e trabecular no interior do osso (adaptado de [14]).

O esqueleto humano adulto é composto de 80 % de osso cortical e 20 % de osso trabecular. Diferentes ossos e locais esqueléticos dentro dos ossos têm diferentes proporções de osso cortical e trabecular. Por exemplo, uma vértebra é composta de osso cortical a trabecular numa proporção de 25:75 [17, 18].

Por sua vez, ambas as formas do osso, são classificadas de acordo com a sua porosidade, estrutura e atividade metabólica, que são responsáveis por modelar a sua função e fisiologia. O osso cortical é altamente denso e consiste numa estrutura hierárquica, cada qual com uma escala de tamanho diferente. Estes variam consoante os osteões cilíndricos (10-500 μm), lamelas (3-20 μm) e o composto colagénio-mineral (60-600 nm) [27, 28].

Os osteões são responsáveis pela resistência do osso cortical. Estes incluem o canal de *Havers* central, que é composto de vasos sanguíneos interconectados com vasos na superfície do osso através de canais perfurantes (canais de *Volkman*) (Figura 3). Cada osteão apresenta 5-20 lamelas concêntricas ao redor do canal central. As lamelas são camadas de osso geralmente de 3 a 7 μm de espessura. A principal função do osso cortical é fornecer resistência à torção, flexão e resistência ao esmagamento [16, 29, 30].

Em contraste, o osso trabecular é altamente poroso, consistindo numa rede interconectada de trabéculas que geralmente é preenchida com medula óssea. A sua estrutura hierárquica varia consoante as trabéculas (75-200 μm), lamelas (1-20 μm) e o composto colagénio-mineral (60-600 nm). As trabéculas porosas fornecem uma área de superfície elevada que permite a difusão de nutrientes e a exposição a fatores de crescimento circundantes. Esse acesso permite que o tecido ósseo trabecular seja

metabolicamente ativo e possa ser remodelado com mais frequência do que o osso cortical. Em contraste com as lamelas regulares de formato cilíndrico no osso cortical, as lamelas de osso trabecular consistem em formas semicirculares irregulares, o que permite a deformação e absorção de cargas [27-29, 31].

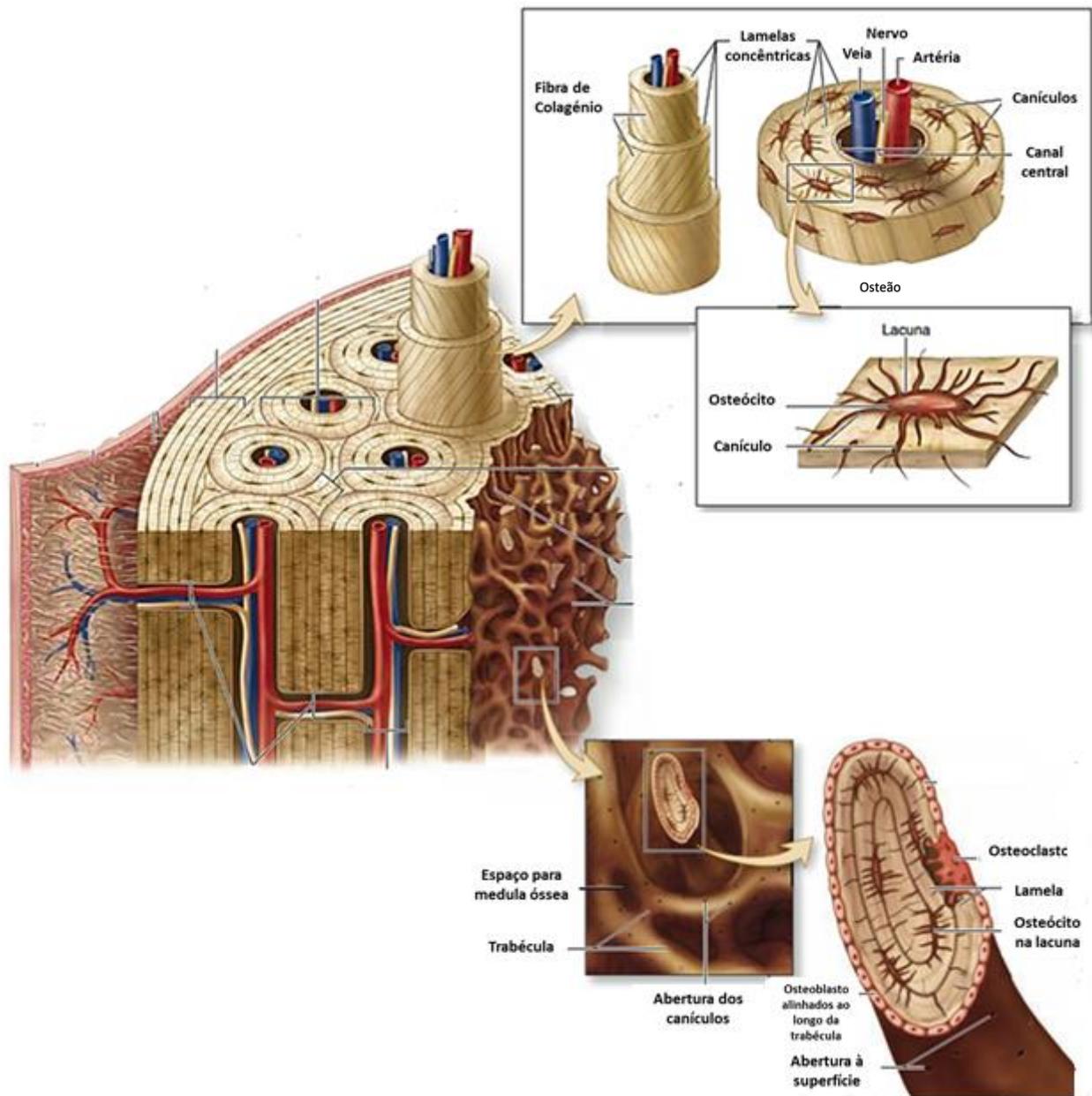


Figura 3: Visão geral esquemática dos componentes principais do osso (adaptado de [14]).

2.1.4. Células Ósseas

Relativamente à atividade celular, existem três classes de células importantes na biologia óssea: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos [16].

2.1.4.1. Osteoblastos

Os osteoblastos são as células primárias responsáveis pela formação óssea (osteogénese) e mineralização. Os osteoblastos são originados a partir de células mesenquimais do estroma que apresentam o potencial de proliferar e a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células do tecido conjuntivo, dependendo da natureza do estímulo no seu microambiente local. Dados os estímulos apropriados para se diferenciar em osteoblastos, numa fase inicial darão origem a células osteoprogenitoras, células ainda capazes de proliferar, mas comprometidas com a linhagem dos osteoblastos [16].

Os osteoblastos são geralmente de forma cuboidal ou colunar, e são encontrados revestindo as superfícies ósseas em locais de formação óssea ativa, como durante o desenvolvimento ósseo ou reparação de fraturas.

Os osteoblastos secretam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento. Adicionalmente, são responsáveis pela produção do colagénio e dos proteoglicanos que compreendem, em grande parte, a componente orgânica da matriz óssea, também conhecido como osteóide [16].

2.1.4.2. Osteócitos

Em contraste com os osteoblastos, os osteócitos são células ósseas alojadas no interior do osso. Estas células compreendem 90 % a 95 % de todas as células ósseas. Por sua vez, resultam da diferenciação de osteoblastos (Figura 4) que ficaram aprisionados e cercados por matriz óssea [16].

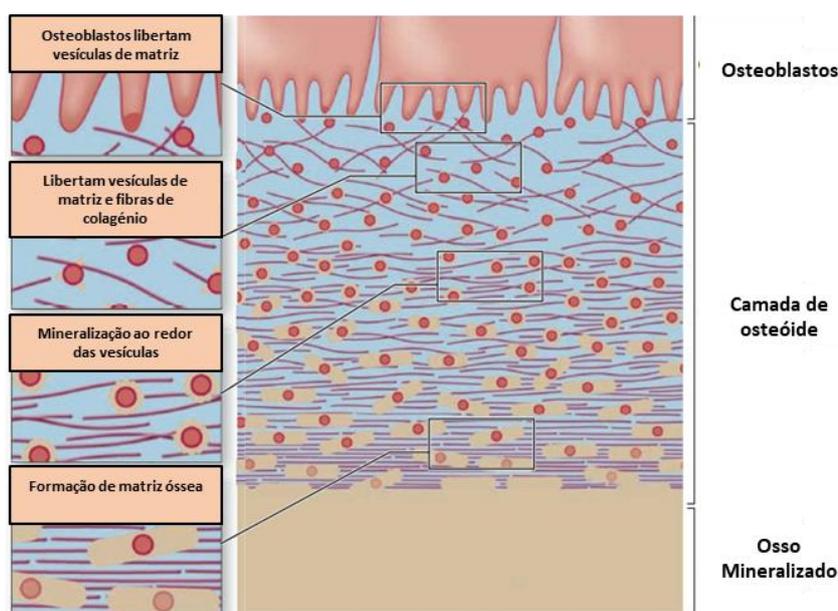


Figura 4: Processo de mineralização da matriz óssea (adaptado de [14]).

Os espaços que os osteócitos ocupam são conhecidos como lacunas. Esta classe de células está envolvida na sinalização celular e na manutenção da viabilidade da matriz óssea. Os osteócitos comunicam entre si e com osteoblastos através de uma rede de canaliculos. Desta forma, são unidos por junções comunicantes, permitindo que esta vasta rede de células dentro da matriz óssea comunique entre si e com células fora da matriz óssea, possibilitando ainda a difusão de nutrientes. Acredita-se também que os osteócitos são importantes para eventos celulares, como a formação e remodelação óssea [16].

2.1.4.3. Osteoclastos

Por sua vez, os osteoclastos são células multinucleadas contendo geralmente 3-25 núcleos por célula. Os osteoclastos estão relacionados com a linhagem de monócitos/macrófagos, sendo ambos os tipos celulares derivados de células progenitoras hematopoiéticas. Embora as linhagens dos osteoclastos e osteoblastos sejam independentes umas das outras, a gênese dos osteoclastos requer a presença de osteoblastos, juntamente com uma variedade de citocinas hematopoéticas [16].

Fatores de crescimento são necessários para a proliferação e diferenciação de células progenitoras em osteoclastos. Depois da formação do osteoclastos, outras citocinas são necessárias para a sua ativação e reabsorção óssea [16].

Os osteoclastos são as células primárias de reabsorção óssea, sendo estes encontrados em locais onde ocorre a reabsorção ou, se a reabsorção ativa já ocorreu, dentro de cavidades ou lacunas. Os osteoclastos também podem ser encontrados nos canais de criação de osso cortical [16].

2.1.5. Remodelação Óssea

A remodelação óssea ocorre continuamente ao longo da vida. O crescimento ósseo envolve tanto a reabsorção contínua do tecido ósseo formado anteriormente, quanto a formação simultânea de osso novo [29].

A simultaneidade das atividades dos osteoblastos e dos osteoclastos num osso em crescimento constitui a osteogênese, ou o processo de remodelação óssea, responsável pela manutenção da forma geral de cada osso aquando o aumento da sua massa. A taxa de renovação óssea é muito ativa em crianças pequenas, onde pode ser 200 vezes mais rápida que a dos adultos. Em adultos, o esqueleto também é renovado continuamente num processo de remodelação óssea que envolve atividades coordenadas e localizadas da cavidade óssea para reabsorção e formação óssea [29].

No osso cortical, a remodelação inicia-se com a reabsorção das partes de antigos osteões e a produção de novos. Como mostrado na Figura 5, os osteoclastos removem o osso envelhecido e formam pequenas cavidades semelhantes a um túnel. Tais túneis são rapidamente invadidos por células osteoprogenitoras. Os osteoblastos desenvolvem-se, revestem a parede dos túneis e começam a secretar osteóide de maneira cíclica, formando um novo osteão com lamelas concêntricas (Figura 5). Em adultos saudáveis, 5 % a 10 % do osso transforma-se anualmente [29].

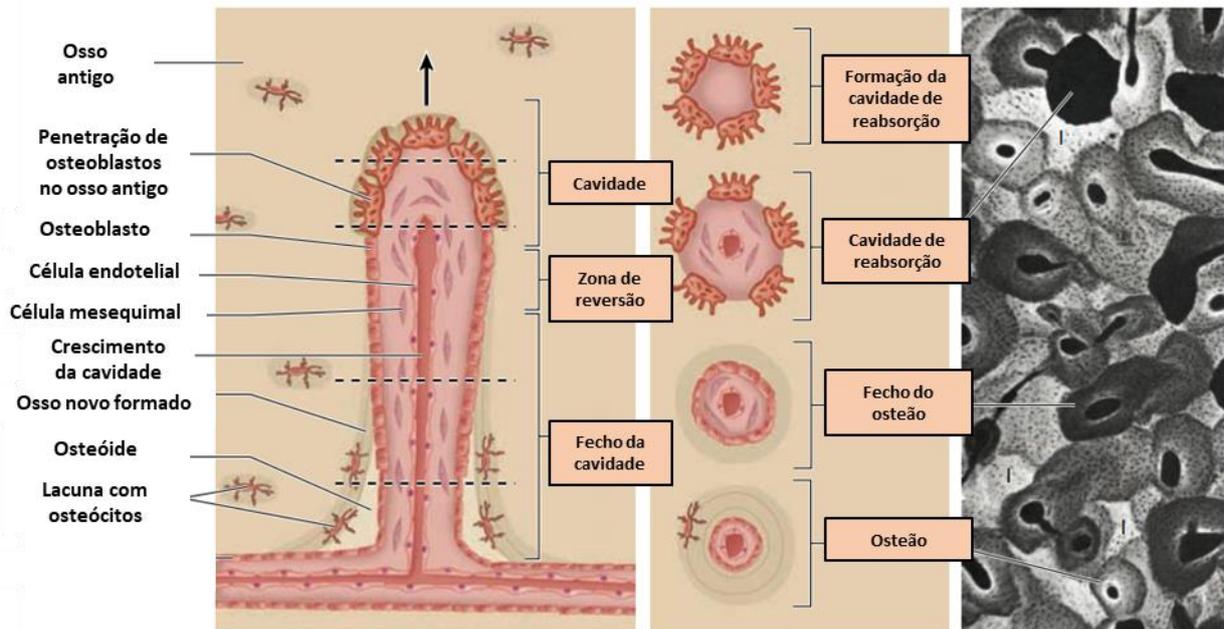


Figura 5: Desenvolvimento de um osteão aquando a remodelação óssea (adaptado de [14]).

Adicionalmente, atendendo à sua extensa vascularização, o osso contém células estaminais osteoprogenitoras na sua estrutura, apresentando, desta forma, uma excelente capacidade de reparação. A regeneração óssea após uma fratura/dano usa células, moléculas de sinalização e processos já ativados pelo processo de remodelação óssea. Lacunas criadas cirurgicamente no osso podem ser cicatrizadas com osso novo. As principais fases que ocorrem tipicamente durante a reparação da fratura óssea, incluem a formação inicial de fibrocartilagem e a sua substituição por um calo temporário de osso fibroso, como mostrado na Figura 6 [29].

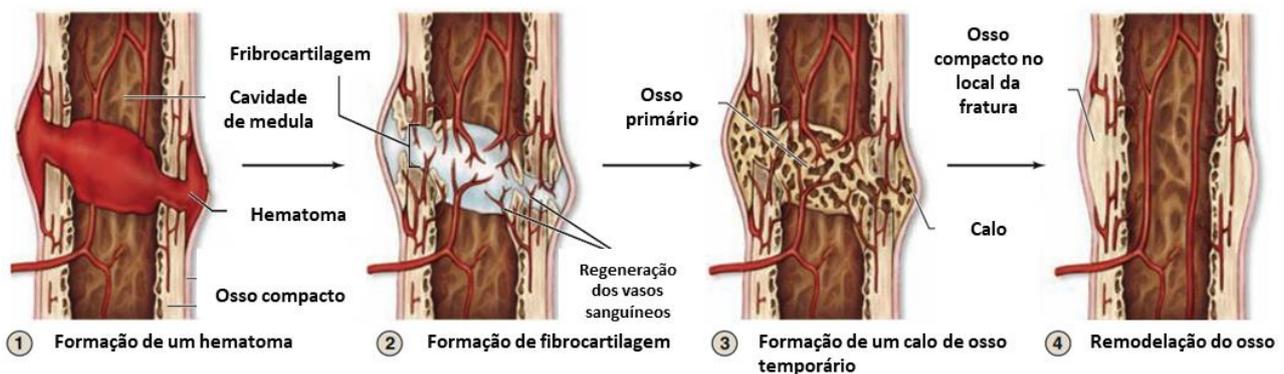


Figura 6: Etapas de reparação de uma fratura óssea (adaptado de [14]).

2.1.6. Propriedades Mecânicas do Osso

As características mecânicas do osso dependem da sua forma, tamanho e estrutura. A diminuição da atividade física pode causar alterações patológicas na força mecânica do tecido ósseo. Alterações negativas nesse tecido também podem estar relacionadas com

lesões e determinadas condições como danos no sistema nervoso, distúrbios hormonais ou tróficos.

Por sua vez, as propriedades mecânicas dependem da proporção de materiais orgânicos e inorgânicos. A componente orgânica do osso é responsável por conferir as propriedades elásticas dos ossos, estando relacionados com a atividade celular que, por sua vez, depende do suprimento sanguíneo correto do tecido ósseo. Por outro lado, a componente inorgânica é responsável pela manutenção estrutural e suporte de cargas mecânicas. As forças às quais o osso é normalmente exposto incluem compressão, tensão, torção, flexão e tensão de corte. As propriedades mecânicas e estruturais do osso encontram-se representadas na Tabela 1 [27, 28, 32].

Tabela 1: Propriedades mecânicas e estruturais do osso cortical e trabecular (adaptado de [32]).

<i>Osso (Carga)</i>	<i>Módulo de Young (GPa)</i>	<i>Resistência à compressão (MPa)</i>	<i>Porosidade (%)</i>	<i>Densidade (g/cm³)</i>
<i>Cortical (Longitudinal)</i>	17 - 20	131 - 244	5 - 10	-
<i>Cortical (Transversal)</i>	6 - 13	106 - 133	-	1,99
<i>Trabecular (Longitudinal)</i>	20	2 - 5	75 - 90	-
<i>Trabecular (Transversal)</i>	14,7	-	-	0,05 - 1

2.2. Substitutos Ósseos

O osso é o único componente anatómico que exibe condições fisiológicas suficientes para uma estabilização mecânica adequada, apresentando excelentes capacidades regenerativas. Contudo, o aumento da esperança média de vida, e o envelhecimento da população, em conjunto com a crescente atividade desportiva com risco de traumas, levou ao incremento do aparecimento de defeitos ósseos e doenças ortopédicas [26].

Desta forma, os defeitos ósseos são altamente usuais e podem ocorrer devido a vários motivos, incluindo distúrbios congénitos, traumas, infeções, tumores ou também fraturas em que ocorra a perda de massa óssea. O osso, é consequentemente, o segundo tecido mais comumente transplantado após o sangue [10, 11, 26].

Para auxiliar a regeneração óssea e, consequentemente, recuperar a estabilidade estrutural do corpo humano, têm vindo a ser desenvolvidos substitutos ósseos que cumpram eficazmente esse objetivo. Um substituto ósseo pode ser definido como um material sintético ou natural usado para promover a regeneração óssea [33].

2.2.1. Propriedades Biológicas

De forma a garantir o cumprimento das suas funcionalidades no corpo humano, os substitutos ósseos devem apresentar um conjunto de propriedades [33].

Idealmente, um substituto ósseo deveria apresentar três propriedades biológicas cruciais para o seu bom desempenho: osteocondução, osteoindução e osteogénese.

A osteogénese consiste na capacidade de promover a diferenciação celular e subsequente formação de novo osso através de células derivadas do hospedeiro ou enxertos. Desta forma, um material com capacidade osteogénica contém células vivas que são capazes de se diferenciar em osteoblastos. Essas células pluripotentes podem ser encontradas, não apenas na medula óssea, mas também no perióstio e nos tecidos moles peritrabeculares, uma vez que derivam de células estaminais indiferenciadas do tecido conjuntivo [4, 5, 8].

Por sua vez, a osteoindução corresponde à capacidade de formação de novo tecido ósseo através do recrutamento ativo de células mesenquimais do estroma do tecido circundante (indiferenciadas), que posteriormente se irão diferenciar em osteoblastos. Este processo é facilitado pela presença de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Além disso, a porosidade é um parâmetro importante que promove a osteoindução, uma vez que os poros permitem que os vasos sanguíneos e os fluidos corporais migrem e fluam através da estrutura do enxerto, conferindo, desta forma, altos níveis de vascularização [5, 9, 26].

Por fim, a osteocondução refere-se à capacidade de suportar a ligação de células osteoblásticas e osteo-progenitoras e de permitir a sua migração e crescimento, dentro da arquitetura tridimensional do enxerto, de modo que, com a participação de vasos sanguíneos que contenham os componentes necessários, a formação óssea seja possível. Portanto, um material osteocondutor promove a aposição óssea na sua superfície. Todos os biomateriais devem apresentar esta característica [4, 5, 34].

Adicionalmente, a osteointegração é definida como a capacidade de adesão do material implantado, dependendo da sua capacidade de formar tecido ósseo ao redor do implante, na interface osso-implante, sem a formação de tecido fibroso [34].

2.2.2. Classificação

Relativamente à sua categorização, os substitutos ósseos podem ser classificados em função de sua origem. Desta forma, existem vários tipos de substitutos no mercado (enxertos autógenos, aloenxertos, xenoenxertos e enxertos sintéticos) [9].

Um enxerto autógeno pode ser definido como qualquer tecido que é transferido de um lugar para outro no mesmo indivíduo, sem risco de transmissão de doenças ou de desencadeando de respostas imunes. Outra das suas vantagens refere-se ao seu potencial de integração à zona recetora, através dos mecanismos de formação óssea, incluindo a osteogénese, osteoindução e osteocondução [4, 9].

O aloenxerto consiste no processo no qual o osso é removido de um indivíduo e colocado num indivíduo geneticamente diferente, mas da mesma espécie. São removidos todos os componentes celulares do enxerto a fim de minimizar a rejeição por parte do paciente alvo e, adicionalmente é cuidadosamente tratado para eliminar a possibilidade de transmissão de doenças. Embora não contenham células vivas, este tipo de enxertos podem possuir propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, facilitando a sua integração pelo organismo. Para além disso, não precisam de um segundo local cirúrgico.

Contudo, podem representar um foco de transmissão de doenças e conter potencial antigénico. A sua capacidade osteogénica inexistente, bem como seus altos custos, consistem noutras desvantagens associadas aos aloenxertos [7, 9].

Quando o tecido ósseo é transferido entre dois membros de espécies diferentes é classificado como um xenoenxerto. Se os tecidos transferidos são aplicados num local anatomicamente similar, o enxerto é denominado como ortotópico, por sua vez, se o local de implantação for diferente, o enxerto é heterotópico. Esta classe de enxertos necessita de tratamento antigénico, deslipidização e desproteínização, o que reduz drasticamente as suas capacidades osteoindutoras [8, 9].

Por sua vez, os enxertos ósseos sintéticos são compostos por materiais biocompatíveis projetados para atender às mesmas funções básicas dos enxertos ósseos naturais, mas têm maior consistência e abundância, sendo que não apresentam risco de transferência de patologias ou de potencial antigenicidade. No entanto, esses materiais não possuem atividade osteogénica [7-9].

2.2.3. Materiais Sintéticos

A necessidade de reparar o tecido ósseo danificado levou ao desenvolvimento de várias soluções de reconstrução óssea e engenharia de tecidos, nomeadamente de enxertos ósseos. Contudo, cada tipo de enxerto é confrontado com desvantagens, como o risco de contaminação biológica, infeção e absorção rápida (para xenoenxertos); coleta e armazenamento difíceis, alto risco de células tumorais e transferência de patógenos (para aloenxertos); baixa disponibilidade, procedimentos cirúrgicos adicionais, cicatrizes e cicatrização prolongada da área colhida (para autoenxertos). Desta forma surgiu a necessidade de recorrer à utilização de materiais sintéticos. Os benefícios dos enxertos sintéticos incluem a sua disponibilidade, esterilidade e redução da morbidade [23, 33, 35-37].

Os materiais mais utilizados para produzir enxertos ósseos sintéticos são os biocerâmicos e os metais. Os metais têm características técnicas ideais, mas não têm capacidade de induzir a regeneração óssea. Por sua vez, os biocerâmicos consistem numa grande classe de cerâmicos especialmente projetados para a reparação e reconstrução de partes doentes ou danificadas do osso [3, 11].

2.2.3.1. Biocerâmicos

Os biocerâmicos podem ser classificados em três grandes famílias com base na sua resposta tecidual: cerâmicos quase inertes, bioativos e reabsorvíveis.

Os materiais inertes (alumina, zircónia) têm aplicações específicas de tecidos duros, contudo não são reabsorvíveis e não possuem a capacidade de interagir com o tecido ósseo, portanto, não contribuem para o processo regenerativo do osso. Por sua vez, os cerâmicos bioativos, como biovidros, são capazes de se ligar ao osso e melhorar a formação de tecido. Dada a sua semelhança com o tecido ósseo, estes cerâmicos induzem um mecanismo de interface que leva a uma libertação de iões cálcio e fosfato. Isso resulta numa conexão entre o cerâmico e o osso. Os biomateriais reabsorvíveis são capazes de se

incorporarem no processo natural de remodelação óssea, dissolvendo-se e sendo substituídos por tecido ósseo ao longo do tempo [1, 2, 38].

Ambos os cerâmicos bioativos e reabsorvíveis apresentam capacidades regenerativas do tecido ósseo. Dentro destas classes existem vários tipos de material incluídos, tais como, sulfato de cálcio, fosfatos de cálcio (CaPs), cimentos, vidros bioativos e combinações de CaPs com polímeros. Individualmente, estes biocerâmicos sintéticos não possuem a capacidade de formação de tecido ósseo e demonstram suporte estrutural mínimo imediato. No entanto, quando ligados a ossos saudáveis, demonstram propriedades osteocondutoras que lhes conferem a capacidade de promover a regeneração do osso [39].

Os fosfatos de cálcio, por possuírem similaridade química com o osso, têm a capacidade de induzir respostas biológicas semelhantes à do osso, sendo, portanto, amplamente selecionados para aplicações biomédicas [35-37, 40].

Os fosfatos de cálcio podem ser classificados consoante o seu rácio Ca/P, conforme representado na Figura 7a). Desta forma, as suas propriedades podem variar conforme mostrado na Figura 7b). Materiais que contêm altos níveis de iões Ca^{2+} apresentam baixa capacidade de reabsorção como é o caso da hidroxiapatite (razão Ca/P de 1,67), enquanto que materiais com baixos níveis de iões Ca^{2+} apresentam propriedades de reabsorção mais altas, como o fosfato dicálcico [40].

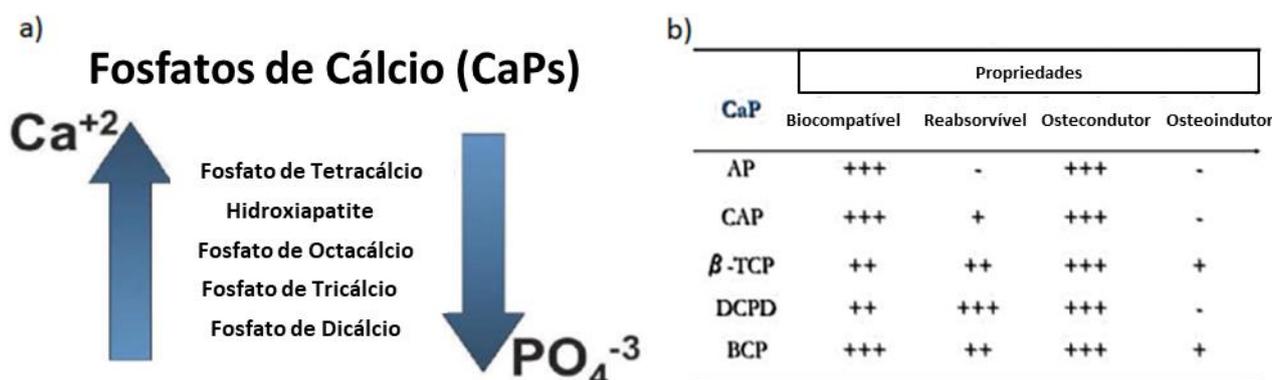


Figura 7: Classificação e propriedades dos fosfatos de cálcio (adaptado de [22]).

Dentro da classe dos CaPs, a hidroxiapatite consiste no material mais utilizado, sendo a sua grande desvantagem a baixa taxa de absorção. Por sua vez, o β - Fosfato de Tricálcio (β - TCP), com a fórmula química de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e relação Ca/P de 1,5, é também vastamente utilizado devido à sua taxa de absorção mais elevada, comparativamente com a HAp.

Por sua vez, os fosfatos de cálcio bifásico (BCP) correspondem a combinações de dois ou mais CaPs e são, usualmente, projetados para combinar as vantagens da HAp e do β -TCP, permitindo a manipulação da taxa de degradação do produto, através do ajuste da concentração de cada um dos componentes. Uma relação de 60 % de hidroxiapatite e 40 % de β -TCP é a combinação comercial mais comum. Na Tabela 1 encontram-se representados alguns substitutos ósseos atualmente comercializados que apresentam estes compostos na sua composição.

Tabela 2: Lista de alguns substitutos ósseos atualmente disponíveis no mercado.

EMPRESA	PRODUTO	COMPOSIÇÃO	POROSIDADE	FORMA
<i>SBM France</i>	Otis	B-TCP	50%	Blocos
<i>THOMMEN Medical</i>	CEROS TPC	B-TCP	60%	Pó (tamanho de partículas: 0,5-0,7 mm; 0,7-1,4 mm)
<i>Strauman</i>	Cerabone	HAp	Porosidade Aberta: 65-80% (100-1500 μm)	Pó/Blocos
<i>Lasak</i>	OssaBase-HA	HAp	83% interconnected porosity	Grânulos (0,3-2,0 mm)
<i>Hannox International Corp</i>	BICERA	HAp (60 %) B-TCP (40 %)	70% Macroporos: 300-600 μm Microporos: < 10 μm	Pó/Blocos
<i>MedBone Biomaterials</i>	Adbone BCP	HAp (75 %) B-TCP (25 %)	80% (300-500 μm)	Pó (0,1 - 2 mm) Cilindros (8x20 mm) Blocos (5x10x15; 8x8x20 mm)
<i>Amed</i>	OSTEON II	HAp (30 %) B-TCP (70 %)	70% (250 μm)	Pó

2.2.4. Porosidade

Uma das principais características a ter em consideração num material projetado para uma aplicação em regeneração óssea é a sua porosidade. A porosidade é definida como a percentagem de vazios numa estrutura sólida, sendo esta propriedade morfológica independente do material [41].

Substitutos ósseos com elevados níveis de porosidade apresentam uma elevada área superficial e, desta forma, mais locais suscetíveis a ligação química com osso, garantindo uma boa fixação mecânica. Além de aumentar a área de superfície para melhor adesão do substituto ósseo, a porosidade proporciona a capacidade de transportar fatores de crescimento (para induzir o crescimento tecidual) e fármacos (para o tratamento de patologias) [41, 42].

A estrutura e morfologia dos poros, especialmente o seu diâmetro e interconectividade, são critérios cruciais para o desenvolvimento de estruturas adequadas para engenharia de tecidos com propriedades mecânicas favoráveis. A estrutura tridimensional porosa facilita a ligação, migração e proliferação celular, o crescimento do tecido e a difusão de nutrientes e células, contribuindo para a osteointegração do substituto ósseo [12, 42].

Relativamente ao seu tamanho, os poros podem ser classificados em três categorias: nanoporos (<0,1 μm), microporos (na faixa de 0,1 μm a 10 μm) e macroporos (poros > 100 μm).

Poros de tamanho pequeno, micrométrico ou nanométrico, apresentam um efeito crítico sobre a resposta biológica, influenciando a adsorção de proteínas, a adesão celular e a difusão de nutrientes [41, 43, 44].

Por sua vez, o papel da macroporosidade é permitir a acessibilidade dos fluidos fisiológicos e a angiogénese, de forma a apoiar o crescimento interno do tecido dentro do material [43].

O efeito da macroporosidade só é possível havendo interconectividade dos poros. Um material poroso pode apresentar poros fechados (isolados) e/ou poros abertos (interconectivos). A porosidade aberta caracteriza-se pela sua elevada interconectividade que permite a permeabilidade de gases e líquidos através da estrutura tridimensional do enxerto. [41].

2.2.4.1. Técnica de formação de espuma

As características dos poros (tamanho e interconectividade) variam consoante a produção e processamento dos substitutos ósseos. Para a produção de estruturas cerâmicas porosas, são geralmente utilizados métodos tais como: incorporação de um suporte de espaço removível [45], sol-gel [46], *gel-casting* [47, 48], impressão 3D [49], modelos de replicação de esponjas/gel polimérico [50, 51], uso de agentes porogénicos [52], bem como muitas outras abordagens. Alguns destes processos de fabricação envolvem várias etapas de processamento que podem ser trabalhosas, demoradas e dispendiosas [41, 44, 53].

Recentemente tem vindo a ser estudada a obtenção de estruturas porosas cerâmicas através da formação de espumas. Esta técnica destaca-se pela sua simplicidade, baixo custo e reprodutibilidade [14, 15].

Uma espuma consiste numa fração volumétrica de gás disperso num líquido, onde o líquido forma uma fase contínua. Para gerar a espuma, as superfícies das interfaces líquido/ar (lamelas) precisam de ser estabilizadas por camadas de um agente tensioativo. Sendo essa a razão pela qual os líquidos puros não possuem a capacidade de formar espumas. A espuma é sempre acompanhada por um aumento da área interfacial e, portanto, da sua energia livre. Assim, em termos termodinâmicos, as espumas são basicamente instáveis e são, portanto, inevitavelmente destruídas. Por sua vez, os surfactantes tem vindo a ser vastamente utilizados como agentes espumantes [54].

Os surfactantes consistem em agentes tensioativos constituídos por duas estruturas: grupos de cabeças polares (hidrofílicas, lipofóbicas ou oleofóbicas) e grupos terminais não polares (hidrofóbicos, lipofílicos ou oleofílicos) - Figura 8. O grupo hidrofílico torna o surfactante solúvel em solventes polares, como a água. O grupo hidrofóbico torna o surfactante solúvel em solventes não polares e óleo. Os tamanhos e formas relativos das partes hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula do surfactante determinam muitas das suas propriedades [54].

Adicionalmente, a porção hidrofílica de um surfactante pode apresentar uma carga negativa, positiva ou nula. Estes são classificados como surfactantes aniónicos, catiónicos e anfotéricos ou não iónicos, respetivamente [54].

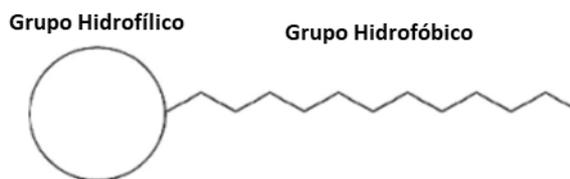


Figura 8: Estrutura simplificada de um surfactante (adaptado de [57]).

Em meio aquoso, as moléculas de surfactante migram para as interfaces ar/água e sólido/água e orientam-se de forma a minimizar, tanto quanto possível, o contato entre os seus grupos hidrofóbicos e a água. Esse processo é chamado de "adsorção" e resulta numa alteração das propriedades na interface. Da mesma forma, uma maneira alternativa para limitar o contato entre os grupos hidrofóbicos e a água é a agregação das moléculas de surfactante com os grupos hidrofílicos orientados para a fase aquosa. Esses agregados de moléculas surfactantes variam em forma, dependendo da concentração do surfactante. O processo de agregação é chamado de "micelização" e os agregados são conhecidos como "micelas". As micelas começam a formar-se a partir de uma determinada concentração, frequentemente muito baixa, denominada como concentração micelar crítica (CMC) [54].

Assim sendo, um ponto crítico nesta abordagem é a seleção do surfactante, que deve ser solúvel em água e deve apresentar biocompatibilidade. De acordo com a seleção do surfactante, é necessário ter em consideração a sua concentração micelar crítica. Para obtenção de espumas, o surfactante deve estar presente numa concentração acima da CMC, uma vez que a promoção da estabilidade da espuma é alcançada quando uma concentração significativa de micelas está presente na solução [55-59].

Relativamente à caracterização das espumas, as principais propriedades a ter em consideração devem ser a análise da espumabilidade e da estabilidade da espuma. A espumabilidade refere-se à capacidade de formação da espuma de um determinado agente espumante. Por sua vez, a estabilidade da espuma refere-se ao tempo de vida e à forma como as propriedades da espuma variam ao longo do tempo após a sua geração [60, 61].

As espumas aquosas evoluem irreversivelmente ao longo do tempo e a partir do momento da sua formação três processos podem ocorrer: drenagem, coalescência das bolhas e rutura. A progressão destes processos determina o tempo de vida da espuma [62].

A drenagem do líquido, que se encontra presente nas zonas interlamelares, ocorre, inicialmente, sobretudo pela ação da força gravitacional. O líquido encontra-se confinado numa rede de canais, denominados limites do *Plateau*, que corresponde às colunas de líquido formadas, assemelhando-se a um triângulo de faces curvas (Figura 9). O canal de *Plateau* desempenha um papel importante na drenagem da espuma, pois essa região, pela curvatura da sua superfície, apresenta uma grande diferença de pressão entre as fases líquida e gasosa. O líquido é então succionado da região lamelar em direção aos canais, onde há menor pressão local [63, 64].

Por sua vez, a coalescência das bolhas e a expansão do gás ocorre através da rutura das lamelas e difusão entre as bolhas. A transferência de gás por difusão ocorre das bolhas menores, nas quais a pressão do gás aprisionado é maior, para as bolhas adjacentes

maiores, resultando numa alteração na distribuição dos tamanhos inicialmente verificada. A espuma pode tornar-se monodispersa ou polidispersa dependendo da mobilidade do líquido em relação à rapidez com que o gás expande. A difusão torna-se mais pronunciada quando as zonas interlamelares atingem menores espessuras e é afetada pela permeabilidade do gás através das lamelas. Quanto maior a polidispersidade da espuma, maior o efeito desse processo [63-65].

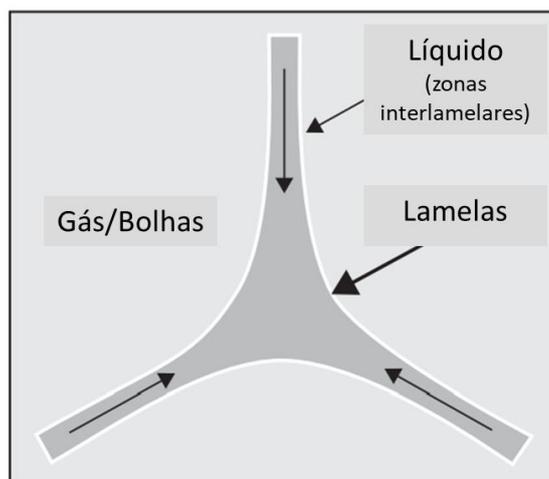


Figura 9: Esquematização da fronteira de *Plateau* na espuma de um surfactante (adaptado de [64]).

Por sua vez, nalgumas aplicações, o agente espumante não é suficiente para garantir a estabilidade da espuma, sendo necessário adicionar mais do que um componente para aumentar o tempo de vida da espuma (macromoléculas como polímeros, proteínas ou partículas). Recentemente, alguns polímeros tornaram-se frequentemente usados como aditivos para soluções de formação de espuma, principalmente em conjunto com surfactantes. Similarmente aos surfactantes, alguns polímeros podem adsorver nas interfaces e assim estabilizar as lamelas e zonas interlamelares da espuma. Além disso, a adição de polímeros aumenta a viscosidade de soluções espumantes permitindo a estabilização da espuma por meio do retardamento do processo de drenagem e da redução da permeabilidade dos gases através das lamelas da espuma. Uma grande quantidade de pesquisas nesta área tem vindo a ser realizadas de forma a estudar as propriedades de filmes líquidos finos estabilizados por misturas de polímero-surfactante [60, 63, 66].

2.2.4.1.1. Surfactante *Pluronic F127*

O *Pluronic F127* (PF127) é um surfactante não iónico composto por polioxietileno (PEO) - polioxipropileno (PPO), sendo constituído por unidades destes dois tipos de blocos. O PEO é de natureza hidrofílica e circunda a parte hidrofóbica (PPO) (Figura 10). O PF127 consiste num surfactante seguro, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para aplicações biomédicas. [58, 59].

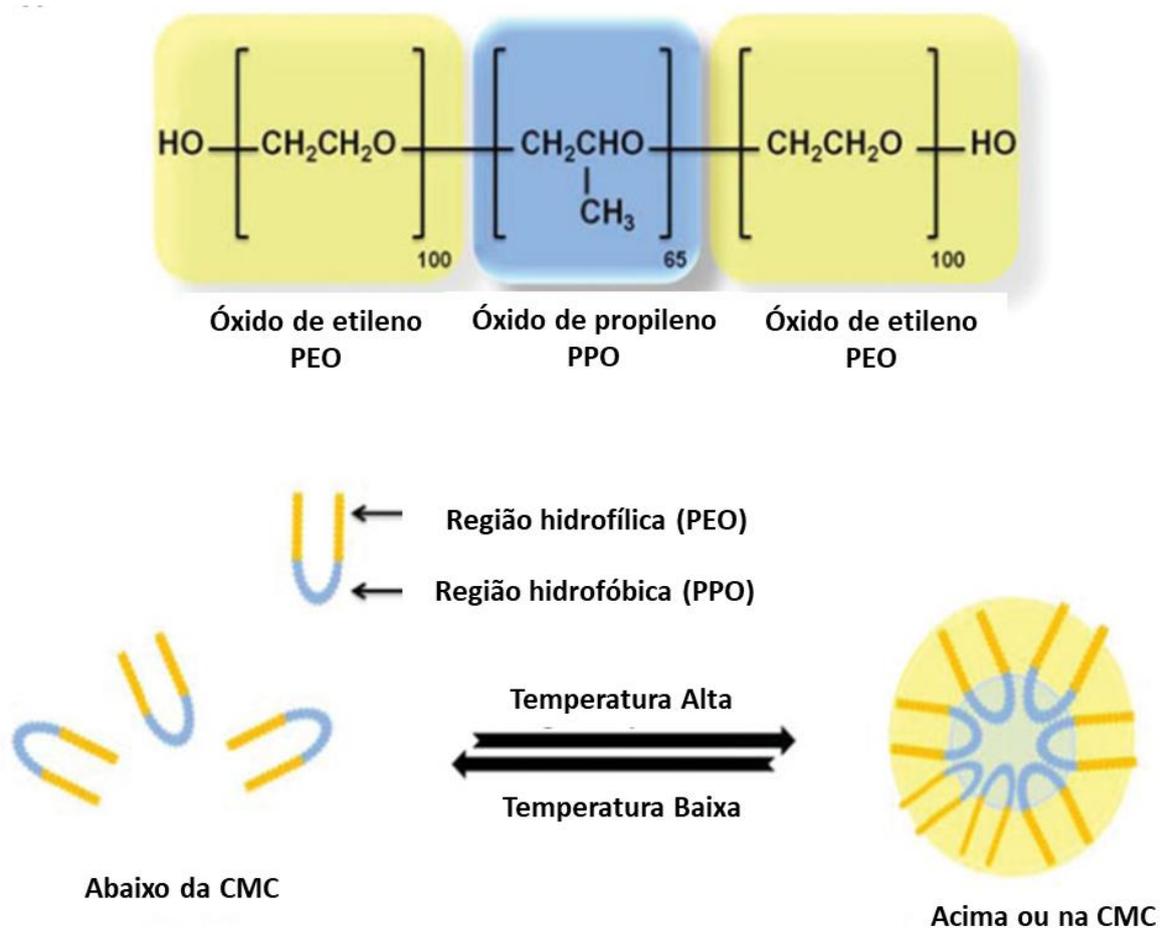


Figura 10: Representação esquemática da constituição do surfactante *Pluronic F127* (adaptado de [59]).

A solubilidade do Pluronic F127 depende de dois parâmetros: temperatura e concentração. Vários copolímeros com bloco hidrofílico de polioxi-etileno apresentam o chamado “*cloud point*” ou “*clouding temperature*” (“ponto de turvação” ou “temperatura de nuvem”). Este fenómeno é descrito como uma diminuição da sua solubilidade em água à medida que a temperatura do sistema aumenta, devido à quebra das ligações de hidrogénio entre o polioxi-etileno e a água. Desta forma, o composto começa a formar uma segunda fase que confere turbidez ao sistema (gel). A temperatura a partir da qual ocorre a formação dessa nova fase é conhecida como “*cloud point*” e as propriedades do surfactante podem ser perdidas a partir de então [58, 67-69].

Por sua vez, à medida que a concentração destes copolímeros aumenta, acontece o mesmo fenómeno, sendo que as suas soluções começam a tornar-se mais viscosas até atingir um estado de gel. A geleificação acontece pelo empacotamento das micelas. A menor concentração a partir da qual se observa esse fenómeno é a concentração crítica de formação de gel. Essa transição fluído-gel (solução-gel) pode ser revertida através da diminuição da temperatura ou, para algumas concentrações, o estado de gel possui uma temperatura máxima, acima da qual ele volta a ser fluído [55-58].

2.2.4.1.2. Surfactante *Tween80*

Os polisorbatos (*Tweens*) são uma classe de surfactantes não iônicos que têm ampla aplicação médica devido à sua alta capacidade de solubilização, potencial de estabilização e biocompatibilidade [70].

O *Tween80* (T80) ou polisorbato 80 (Figura 11), é um surfactante não iônico hidrofílico, com uma CMC de 0,012 mM. Os grupos hidrofílicos deste composto são poliéteres, também conhecidos como grupos polioxietileno. Na nomenclatura dos polisorbatos, a designação numérica após o polisorbato refere-se ao grupo lipofílico, neste caso o ácido oleico [70].

Este surfactante é aprovado pela FDA, sendo amplamente utilizado como transportador de fármacos [15, 71].

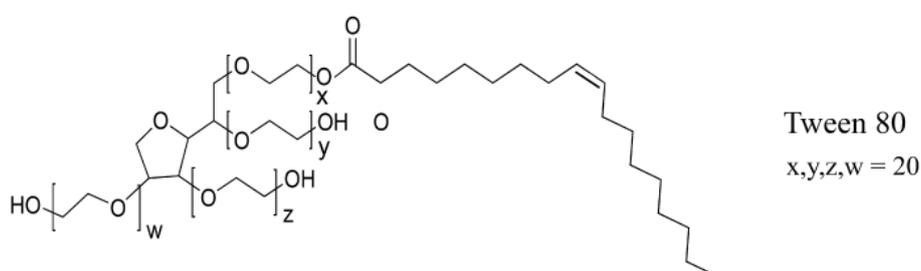


Figura 11: Representação do surfactante *Tween80* (adaptado de [70]).

Além da sua eficiência como agente espumante, o *Tween80* tem a vantagem adicional de garantir boas propriedades às espumas formadas, aumentando o seu tempo de vida [72].

3. Procedimento Experimental

3.1. Matérias-Primas

Os materiais utilizados ao longo do procedimento experimental foram o pó cerâmico de hidroxiapatite (HAp, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, *Sigma-Aldrich*, Ref. P21223), alginato de sódio ($(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na})_n$, *PanReac AppliChem*, Ref. A3249.0250), *Pluronic® F-127* (F-127, *Sigma-Aldrich*, Ref. P2443), *Tween®80* (*Sigma-Aldrich*, Ref. P1754) e cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, *PanReac AppliChem*, Ref. 131232.1211).

3.2. Caracterização das Matérias-Primas

3.2.1. Análise Granulométrica

A distribuição do tamanho das partículas do pó de HAp utilizado foi analisada recorrendo-se a um instrumento de dispersão laser (*COULTER LS230, UK*), com um modelo ótico de *Fraunhofer*. O ensaio foi realizado no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

3.3. Estudo da Espumabilidade e da Estabilidade da Espuma

A obtenção das esferas cerâmicas porosas foi realizada através duma metodologia que envolve, numa fase inicial a formação de espumas através da utilização de um agente espumante, nomeadamente, um surfactante. Por conseguinte, existem duas propriedades que devem ser tidas em consideração quando se utiliza esta técnica: a espumabilidade e a estabilidade da espuma. A estabilidade da espuma foi analisada com base na variação do seu volume ao longo do tempo. Por sua vez, a espumabilidade foi definida como o aumento relativo do volume na solução de surfactante quando o ar é incorporado durante o processo de formação de espuma, sendo calculada a partir da seguinte expressão, onde V_f consiste no volume imediatamente após a formação da espuma e V_i consiste no volume inicial da solução de surfactante:

$$\text{Espumabilidade (\%)} = \frac{(V_f - V_i)}{V_i} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Neste trabalho foram estudados dois surfactantes distintos (*Pluronic F127* e *Tween80*) com vista a realizar uma análise comparativa das suas propriedades. Adicionalmente, os estudos das propriedades das espumas foram realizados para duas metodologias de agitação diferentes, aplicadas a ambos os surfactantes. Para tal, recorreu-se à técnica *syringe-foaming*, cuja metodologia se encontra esquematizada na Figura 12, e ao uso de um instrumento de agitação elétrico.

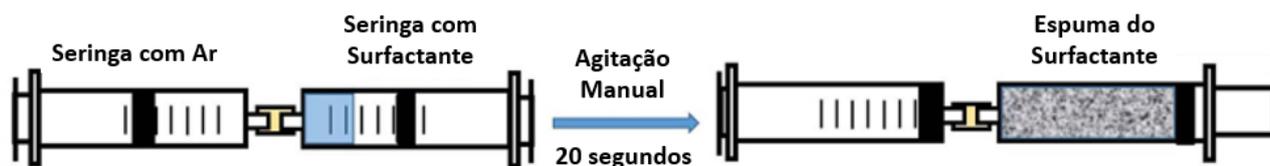


Figura 12: Esquema do processo de formação de espumas através da metodologia *syringe-foaming* (adaptado de [74]).

O processo de produção das esferas cerâmicas envolve duas etapas (representadas na Figura 13), sendo que em ambas é obtida uma espuma.

Na primeira fase de produção é obtida uma espuma da solução do surfactante (ES) através da agitação durante 20 segundos da solução de surfactante. Para a formação desta espuma em algumas formulações foi adicionado um agente estabilizador.

Por sua vez, na segunda etapa é obtida a espuma líquida cerâmica através da agitação durante 20 segundos da espuma da solução do surfactante em conjunto com uma suspensão cerâmica (SC). A suspensão cerâmica é obtida através da prévia adição e homogeneização do pó cerâmico (6 g de HAp) num hidrogel (alginato 2 % (m/v)).

Primeiramente, foi estudada a espumabilidade e estabilidade da espuma da solução do surfactante, analisando-se o efeito de três variáveis distintas para além da metodologia de agitação, nomeadamente, o tipo de surfactante utilizado, o efeito da concentração de surfactante e da adição de um agente estabilizador de espuma (alginato). Para tal, foram preparadas soluções de ambos os surfactantes selecionados (*Pluronic F127* e *Tween80*) em quatro concentrações diferentes (1 %, 4 %, 10 % e 15 % (m/v)). De seguida, analisou-se a estabilidade da espuma líquida cerâmica. Desta forma, a análise da estabilidade da espuma foi realizada para ambas as etapas do processo de produção das esferas, ou seja, para ambas as espumas.

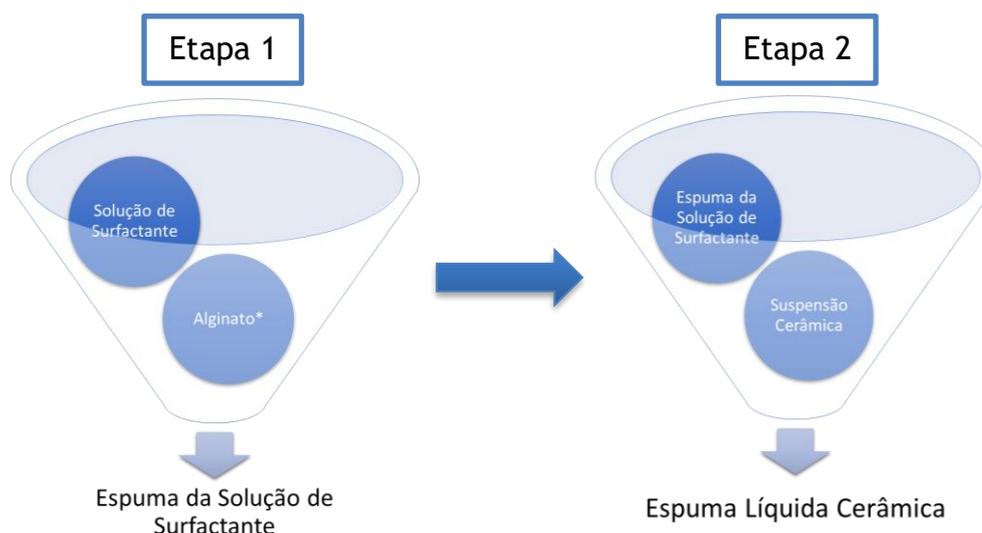


Figura 13: Esquematização das duas etapas de formação de espumas envolvidas na produção de esferas cerâmicas.

*Nota: O Alginato pode ou não ser introduzido para a produção da espuma da solução de surfactante.

A análise da espumabilidade foi efetuada apenas nas espumas da solução de surfactante, uma vez que a espumabilidade da espuma líquida cerâmica se encontra fortemente dependente da espuma da solução de surfactante.

3.4. Formulações das Espumas Líquidas Cerâmicas

Após a caracterização das espumas, foram selecionadas um conjunto de formulações e condições para se proceder à produção das esferas cerâmicas. As composições das formulações testadas encontram-se representadas na Tabela 2.

Tabela 3: Formulações utilizadas para produzir as esferas cerâmicas. As formulações foram denominadas de acordo com o surfactante utilizado, a sua concentração em %(m/v) e o seu volume.

*Nota: O A, presente no final das designações de algumas das formulações, representa o uso de alginato como agente estabilizador de espuma

Formulações	Concentração de sólidos m/v%; (g)	Alginato (SC)		Surfactante		Alginato (ES)	
		Solução m/v%	Formulação v/v%; (mL)	Solução m/v%	Formulação v/v%; (mL)	Solução m/v%	Formulação v/v%; (mL)
HAp - controlo	200,0; (6g)	2	100,0; (12)	–	–	–	–
PF127-10% (3mL)	100,0; (6g)	2	50,0; (12)	10	50,0; (3)	2	–
PF127-10% (3mL)A	85,7; (6g)	2	42,9; (12)	10	42,9; (3)	2	14,3; (1)
PF127-10% (4mL)	85,7; (6g)	2	42,9; (12)	10	57,1; (4)	2	–
PF127-10% (4mL)A	75,0; (6g)	2	37,5; (12)	10	50,0; (4)	2	12,5; (1)
PF127-15% (3mL)	100,0; (6g)	2	50,0; (12)	15	50,0; (3)	2	–
PF127-15% (3mL)A	85,7; (6g)	2	42,9; (12)	15	42,9; (3)	2	14,3; (1)
PF127-15% (4mL)	85,7; (6g)	2	42,9; (12)	15	57,1; (4)	2	–
PF127-15% (4mL)A	75,0; (6g)	2	37,5; (12)	15	50,0; (4)	2	12,5; (1)
T80 - 10% (3mL)	100,0; (6g)	2	50,0; (12)	10	50,0; (3)	2	–
T80 - 10% (3mL)A	85,7; (6g)	2	42,9; (12)	10	42,9; (3)	2	14,3; (1)
T80 - 10% (4mL)	85,7; (6g)	2	42,9; (12)	10	57,1; (4)	2	–
T80 - 10% (4mL)A	75,0; (6g)	2	37,5; (12)	10	50,0; (4)	2	12,5; (1)
T80 - 15% (3mL)	100,0; (6g)	2	50,0; (12)	15	50,0; (3)	2	–
T80 - 15% (3mL)A	85,7; (6g)	2	42,9; (12)	15	42,9; (3)	2	14,3; (1)
T80 - 15% (4mL)	85,7; (6g)	2	42,9; (12)	15	57,1; (4)	2	–
T80 - 15% (4mL)A	75,0; (6g)	2	37,5; (12)	15	50,0; (4)	2	12,5; (1)

De notar que a designação “Alginato (SC)” se refere à solução de alginato utilizada na suspensão cerâmica, por sua vez, a designação “Alginato (ES)” refere-se ao alginato utilizado como estabilizador de espuma. De forma a analisar o efeito do tempo de agitação na microestrutura do cerâmico, foram utilizados dois tempos de agitação (10 e 20 segundos) para cada formulação do PF127, sendo que, para uma mesma formulação o tempo de agitação para as duas etapas foi sempre o mesmo.

3.5. Produção das Esferas

A produção das esferas foi realizada com recurso a um sistema de injeção controlada da espuma líquida cerâmica. A injeção da espuma é controlada por diferentes forças motrizes. Para assegurar o bom desempenho do sistema, a força motriz deve ser mensurável e estável. A força motriz mais comum é a pressão.

Desta forma, a produção das esferas foi realizada com recurso a uma bomba de infusão e a uma peça com secção circular através da qual a espuma líquida cerâmica, previamente coletada numa seringa, foi injetada. Através do sistema estabelecido (Figura 14), as forças aplicadas à seringa foram devidamente ajustadas na bomba infusora, sendo mantido um caudal específico constante (10 $\mu\text{L/s}$). O fluxo constante possibilitou a produção de esferas de uma forma reprodutível.



Figura 14: Sistema utilizado para a produção de esferas cerâmicas.

As esferas, após expelidas da peça circular, foram imersas numa solução de cloreto de cálcio 10 % (m/v), que possibilitou a reticulação do hidrogel incorporado na formulação e, desta forma, a manutenção da forma esférica. Após cerca de 12 horas em imersão na solução de cloreto de cálcio, as esferas foram lavadas em etanol de forma a reduzir as forças electroestáticas entre si e para remover os excessos de cloreto de cálcio à sua superfície.

Por fim, as esferas foram submetidas a um tratamento térmico (representado na Figura 15). O tratamento efetuado apresentou dois estágios distintos. O primeiro estágio, realizado a 700 °C (com uma taxa de aquecimento de 0,5 °C/min) teve duração de três horas e teve como objetivo a eliminação da componente orgânica, nomeadamente, o

alginate e o surfactante. O segundo estágio correspondeu à etapa de sinterização e foi realizado a 1300 °C (taxa de aquecimento de 4 °C/min) durante 1 hora.

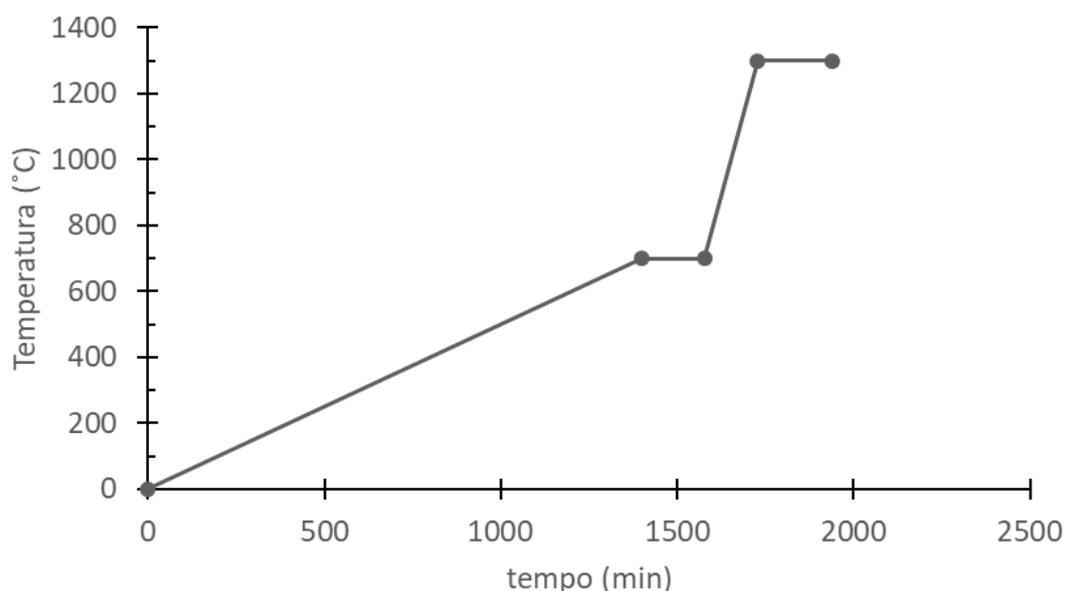


Figura 15: Tratamento térmico utilizado para a combustão da matéria orgânica e sinterização do material cerâmico.

3.6. Caracterização das Esferas

3.6.1. Análise de Fases Cristalinas

A cristalinidade e as fases cristalinas presentes nas esferas, previamente secas e esmagadas, foram identificadas através da técnica de difração de raios-X (DRX). Para tal, recorreu-se a um difratómetro MXP3V (*Mac Science Ltd*, Yokohama, Japão) com radiação CuK α a 45 kV e 40 mA. Os padrões de DRX foram obtidos dentro de uma faixa de 2θ de 0,0260 ° com uma velocidade de varrimento de 96,39 segundos.

3.6.2. Análise Morfológica/Topográfica

A morfologia/topografia das esferas de HAP produzidas foi analisada através de microscopia eletrónica de varrimento (MEV). Desta forma, recorreu-se a um microscópio eletrónico de varrimento de alta resolução, *Quanta 400FEG ESEM/EDAX Genesis X4M*. As amostras foram previamente montadas em araldite, num porta amostras. Após secagem da araldite, as amostras foram revestidas com uma camada de ouro/paládio (Au/Pd), utilizando o equipamento *SPI Module Sputter Coater*. O revestimento foi realizado por pulverização catódica, durante 120 segundos e com uma corrente de 15 mA. Todos os ensaios foram realizados no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).

3.6.3. Determinação da Densidade

A densidade teórica do material utilizado (hidroxiapatite), foi medida através da técnica de picnometria de hélio. Para tal, recorreu-se ao picnómetro *AccuPyc 1330, Micromeritics*. Neste ensaio, o hélio é utilizado como um indicativo de porosidade, penetrando nos poros abertos do material. A quantidade de gás impregnado nos poros da amostra é medida através da variação de pressão que ocorre quando o volume conhecido de hélio expande na amostra de massa conhecida, obtendo-se a densidade do material.

3.6.4. Determinação do Teor de Porosidade

Para determinar a porosidade das esferas cerâmicas, recorreu-se a um método baseado no princípio de Arquimedes.

Para tal, utilizou-se o equipamento representado na Figura 16. Inicialmente, foi medida a massa de uma amostra enquanto estava completamente seca e o seu valor foi registado (P), de seguida, a amostra foi colocada numa rede submersa em água e aguardou-se dois minutos até se registar novamente a massa indicada na balança (A), de forma a garantir que a água penetrava na estrutura porosa das esferas. As medições de P e A foram realizadas em seis amostras para cada condição de processamento diferente.

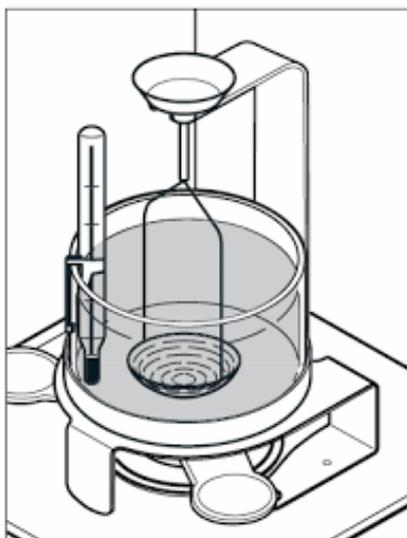


Figura 16: Equipamento utilizado para realizar as medições para determinação da densidade de Arquimedes.

Desta forma, a densidade de Arquimedes foi, então, obtida recorrendo-se à equação 2.

$$\rho (\text{Arquimedes}) = \frac{P}{P-A} \times \rho (\text{água}) \quad (\text{Equação 2})$$

De seguida, foi possível calcular o teor de porosidade aberta e fechada segunda as equações 3 e 4, respetivamente. A grandeza ρ (material) corresponde à massa volúmica teórica do material utilizado e ρ (geométrica) foi calculada a partir da equação 5.

$$\text{Porosidade Aberta (\%)} = \left(1 - \frac{\rho(\text{geométrica})}{\rho(\text{Arquimedes})}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{Porosidade Fechada (\%)} = \left(\frac{1}{\rho(\text{Arquimedes})} - \frac{1}{\rho(\text{material})}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

$$\rho(\text{geométrica}) = \frac{\text{massa da esfera}}{\text{volume estimado da esfera}} \quad (\text{Equação 5})$$

3.6.5. Propriedades Mecânicas

A caracterização mecânica das esferas foi realizada através da execução de ensaios de esmagamento. Os ensaios de esmagamento foram realizados com recurso ao equipamento *Schimazdu EZ-LX Long-Stroke Model*. Para tal, utilizou-se uma célula de carga de 500 N e uma velocidade de 1 mm/min. As esferas foram testadas até ao momento da sua fratura, sendo realizado o ensaio em três esferas correspondentes a cada lote diferente.

4. Apresentação e Discussão de Resultados

4.1. Caracterização das Matérias-Primas

4.1.1. Análise Granulométrica

Na Figura 17 encontram-se representados os resultados dos ensaios de granulometria do pó de HAp utilizado, sob a forma de uma curva de distribuição granulométrica.

É possível observar uma distribuição granulométrica com partículas de tamanho aproximadamente entre 0,1 e 76,4 μm . Adicionalmente, o tamanho de partículas pode ser classificado de acordo com os seguintes índices: D10 (10 % das partículas apresentam um diâmetro superior ao valor de D10), D50 e D90. A partir dos resultados obtidos é possível determinar o tamanho médio da partícula, correspondente ao valor de 5,4 μm (D50). Por sua vez, o D10 e D90 foram 2,1 e 16,6 μm , respetivamente.

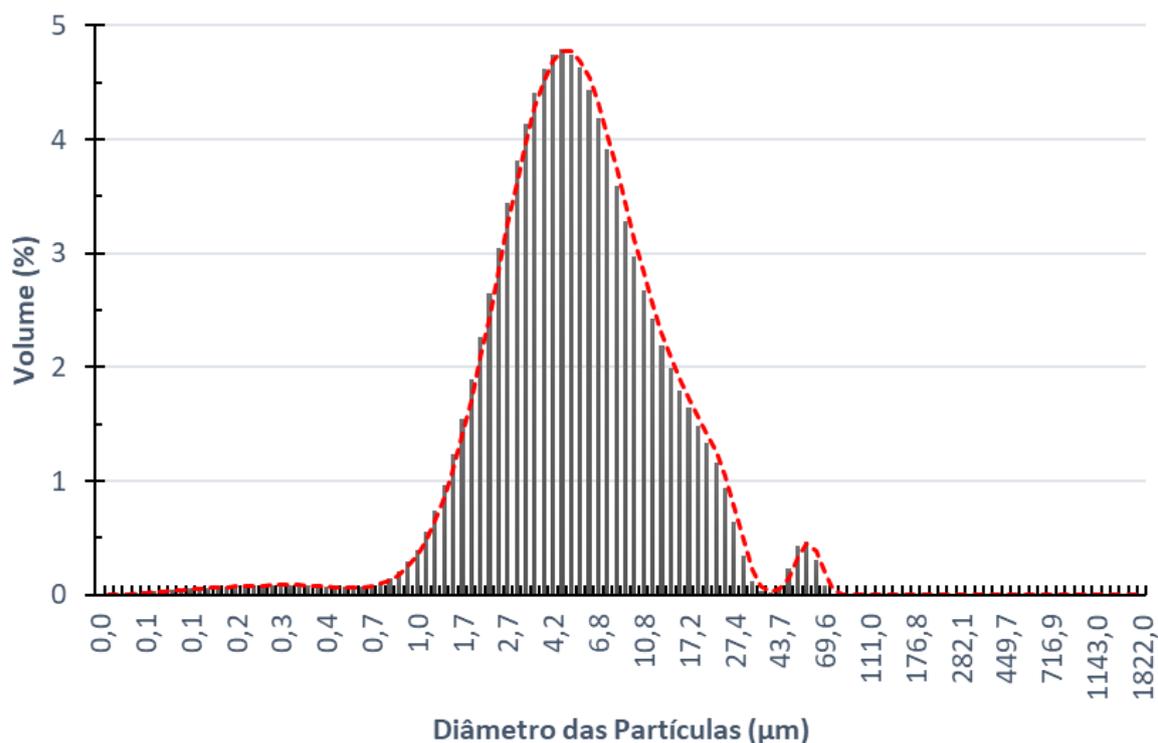


Figura 17: Histograma da distribuição do tamanho de partícula (μm) do pó de HAp utilizado.

4.2. Estudo da Espumabilidade e Estabilidade da espuma

Recentemente, tem vindo a ser estudada a obtenção de estruturas porosas cerâmicas através da formação de espumas recorrendo-se ao uso de um surfactante. Esta técnica foi selecionada para o desenvolvimento deste trabalho devido à sua simplicidade, baixo custo e reprodutibilidade.

As espumas consistem em dispersões de bolhas de gás (fase dispersa) num líquido (fase contínua), apresentando uma interface entre as duas fases denominada por lamelas. As zonas interlamelares correspondem aos locais nos quais se encontra alojado o líquido.

Em líquidos puros (por exemplo, água) as espumas não podem ser geradas sem o uso de agentes espumantes especiais, uma vez que as lamelas e zonas interlamelares são instáveis. A adição de agentes espumantes ao líquido permite a estabilização dessas zonas e, assim, a geração de espumas. Os surfactantes são os principais responsáveis pela existência das espumas líquidas, uma vez que a presença dessas moléculas adsorvidas nas interfaces gás-líquido proporciona a estabilidade da espuma, reduzindo a tensão superficial gás-líquido, modificando a viscoelasticidade dessas interfaces e induzindo forças repulsivas entre as bolhas [12, 62, 73].

As espumas representam sistemas intrinsecamente instáveis, fora de equilíbrio, sendo que as suas propriedades se tornam diferentes ao longo do tempo como resultado de uma mudança na distribuição das fases líquida e gasosa, desta forma, torna-se fundamental o seu estudo [12, 62, 73]. Por sua vez, as propriedades das espumas estão associadas à composição da solução, tipo de material ativo na superfície, presença de aditivos e às condições de formação da espuma. As propriedades comumente caracterizadas são a espumabilidade e a estabilidade da espuma. A espumabilidade de um surfactante é determinada pelo aumento do seu volume durante a agitação mecânica aquando a introdução da fase gasosa na solução do surfactante. A estabilidade pode ser analisada através da variação do volume ao longo do tempo. Estas medidas podem ser realizadas sob condições estáticas ou dinâmicas. Neste trabalho, as medidas foram efetuadas em condições estáticas, visto que não foi utilizado nenhum processo de regeneração [14, 15].

Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar o efeito da metodologia de agitação, do tipo de surfactante, da sua concentração e da adição de um estabilizador de espuma nas propriedades das espumas da solução de surfactante e líquida cerâmica.

4.2.1. Propriedades das Espumas da Solução de Surfactante

As espumas da solução de surfactante foram obtidas através da agitação durante 20 segundos, de uma quantidade específica de surfactante, nomeadamente três mililitros.

Neste trabalho, para a obtenção das espumas foram testadas duas metodologias de agitação diferentes, nomeadamente a técnica *syringe-foaming* e o uso de um instrumento de agitação elétrico.

Adicionalmente, foram utilizados dois surfactantes, *Pluronic F127* e *Tween80*, de forma a possibilitar uma análise comparativa do seu efeito no desempenho durante o processamento e nas estruturas finais das espumas produzidas. Para cada surfactante, foram analisadas soluções em várias concentrações (1, 4, 10 e 15 %(m/v)) de forma a avaliar o efeito do aumento da concentração na espuma produzida.

Por fim, foi analisado o efeito da adição de um agente estabilizador de espuma polimérico, nomeadamente, o alginato.

4.2.1.1. Espumabilidade

A espumabilidade das espumas da solução do surfactante foi determinada através do aumento do seu volume durante a agitação mecânica aquando a introdução da fase gasosa na solução do surfactante.

4.2.1.1.1. Metodologia via *Syringe-Foaming*

Uma das metodologias de agitação consistiu no método *syringe-foaming*. Esta técnica consiste numa metodologia de mistura manual das fases presentes num sistema composto por duas seringas conectadas. Tal metodologia simples, permite o controlo do volume de ar introduzido com mais rigor, comparativamente a outros métodos de formação de espuma. A preparação da espuma líquida cerâmica final através desta técnica dura menos de 2 minutos, sendo um processo simples e fácil de reproduzir. Contudo, esta metodologia exige um desgaste físico do operador uma vez que a agitação é executada manualmente [14, 74].

Numa primeira etapa, analisou-se a espumabilidade de ambos os surfactantes em estudo, com e sem o uso do agente estabilizador. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 18.

Foi possível constatar que a capacidade de formação da espuma através desta metodologia é muito similar para os dois surfactantes. Adicionalmente, a espumabilidade não se alterou significativamente dentro do intervalo de concentrações estudado.

De salientar que na metodologia via *syringe-foaming* a quantidade de ar é definida pelo operador, pelo que a quantidade de bolhas formada se encontra restrita ao ar facultado durante o processo de formação da espuma, independentemente do número de moléculas de surfactante passíveis à criação de interfaces líquido/ar (concentração do surfactante).

Contudo, apesar da concentração não demonstrar um efeito significativo nesta propriedade das espumas, a adição de alginato contribui para um aumento da capacidade de formação da espuma.

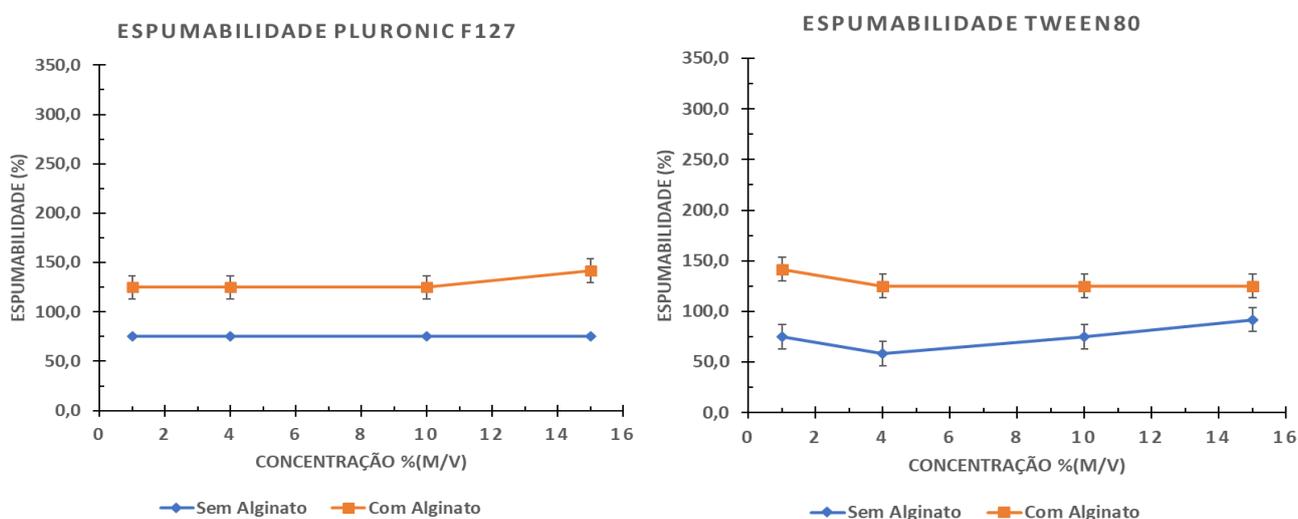


Figura 18: Resultados do estudo da espumabilidade de ambos os surfactantes utilizados, recorrendo-se à metodologia de agitação via *syringe-foaming*.

4.2.1.1.2. Metodologia via Instrumento Elétrico

A segunda metodologia de agitação consistiu no uso de um instrumento de agitação elétrico de potência ajustável, composto por um motor que permite movimentos giratórios a elevadas velocidades. Esta abordagem permitiu, da mesma forma que a técnica *syringe-foaming*, a obtenção de espumas. Contudo, nesta metodologia a quantidade de ar introduzido na espuma é dependente da potência imposta pelo equipamento e do tempo de agitação, não sendo mensurável. Uma vez que a agitação é realizada a velocidades substancialmente maiores do que no método *syringe-foaming*, podemos considerar que a introdução de ar na emulsão será também significativamente maior. Os resultados de espumabilidade obtidos encontram-se representados na Figura 19.

Através da análise dos resultados obtidos, pode observar-se uma variação da capacidade de formação da espuma mediante a concentração do surfactante utilizada, sendo essa variação mais significativa para o *Pluronic F127*.

De facto, alguns estudos indicam que para alguns surfactantes a espumabilidade atinge um máximo num valor de concentração próximo ou acima da concentração micelar crítica. Acima desse valor máximo, a influência da concentração do surfactante na espumabilidade é menos pronunciada [15]. Esta hipótese poderá ser a justificação pela qual os valores da espumabilidade do surfactante *Tween80* não variam consideravelmente para as soluções de concentrações diferentes.

Por sua vez, no caso do *Pluronic F127*, o aumento da espumabilidade para concentrações mais altas deve-se à maior quantidade de moléculas de surfactante presentes nas soluções e capazes de induzir a formação de bolhas. De notar que, através da metodologia empregue neste caso, não há uma limitação na quantidade de ar introduzido na espuma. Desta forma, e contrariamente ao que ocorre na metodologia *syringe-foaming*, para concentrações mais altas existe uma maior capacidade de formação de espuma devido à não restrição de ar incorporado. Outro fator que poderá influenciar a espumabilidade do surfactante é o tempo de agitação, uma vez que a quantidade de ar incorporada na solução é função desse parâmetro. Contudo, este parâmetro não foi estudado na análise das propriedades das espumas, tendo sido utilizado o mesmo intervalo de tempo de agitação para todas a espumas obtidas (20 segundos).

Adicionalmente, tal como acontece na metodologia *syringe-foaming*, a presença de alginato tende a aumentar o valor de espumabilidade para uma mesma concentração.

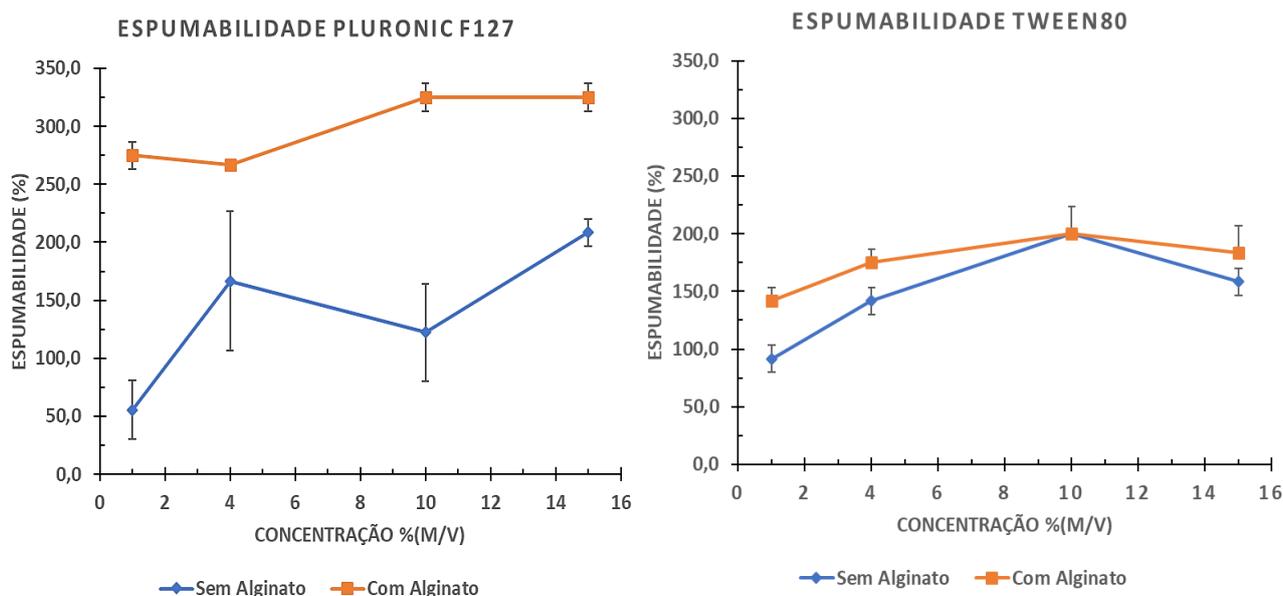


Figura 19: Resultados do estudo de espumabilidade de ambos os surfactantes utilizados, recorrendo-se à metodologia de agitação via uso de um instrumento de agitação elétrico.

4.2.1.1.3. Tamanho das Bolhas na formação da Espuma

Após a formação da espuma, constatou-se que a concentração do surfactante apresenta um efeito notável no diâmetro das bolhas das espumas, sendo que para concentrações maiores o tamanho das bolhas tende a diminuir. Isto ocorre devido à maior quantidade de moléculas de surfactante presentes nas soluções e capazes de induzir a formação de uma maior quantidade de bolhas.

Este efeito é observável na Figura 20, que corresponde às imagens das espumas obtidas através do método *syringe-foaming* e do instrumento de agitação elétrico, respetivamente, imediatamente após a sua formação. As imagens retiradas correspondem a espumas geradas a partir de concentrações de surfactante de 1 e 15 %(m/v), correspondentes aos limites inferior e superior da gama de concentrações em estudo.

Para concentrações mais altas, o aumento do número de bolhas é bastante mais significativo nas espumas obtidas por *syringe-foaming*. Na metodologia *syringe-foaming*, apesar do maior número de moléculas surfactantes acessível, a sua atuação encontra-se limitada para um determinado volume e espaçamento, o que justifica o tamanho das bolhas muito inferior comparativamente com a técnica de agitação elétrica.

Por sua vez, na agitação elétrica não há limitações de espaço e volume para a formação da espuma, sendo que a formação das bolhas ocorre livremente, possibilitando um tamanho de bolhas maior.

Esta análise é importante, uma vez que a espuma líquida irá definir a estrutura da espuma sólida de HAp. Assim sendo, o ajuste da concentração do surfactante poderá proporcionar um método para controlar o diâmetro dos poros da estrutura cerâmica final, consoante o nível de porosidade desejado.

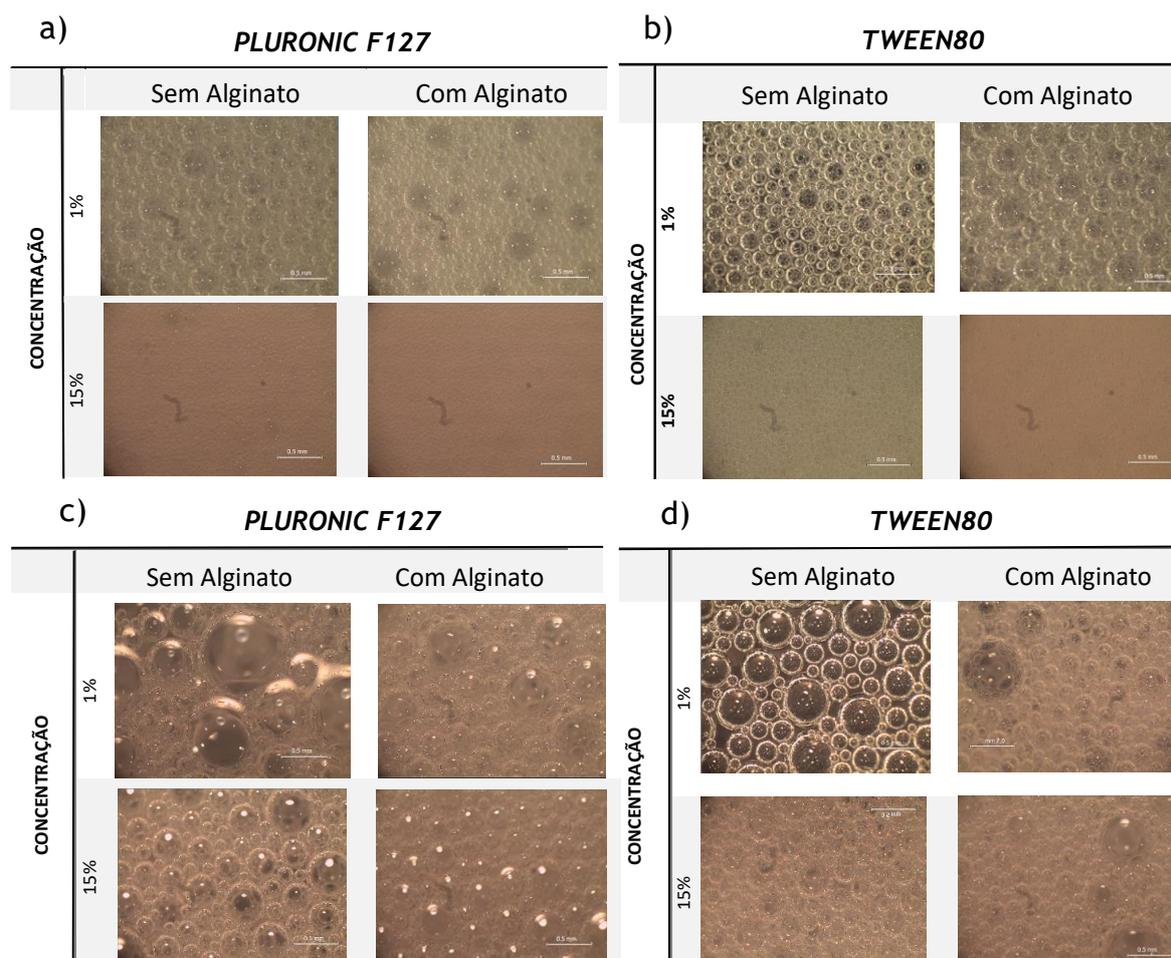


Figura 20: Tamanho de bolhas das espumas imediatamente após a sua produção. a) e b) espumas obtidas a partir da metodologia de agitação via *syringe-foaming*; c) e d) espumas obtidas a partir da metodologia de agitação via uso de um instrumento de agitação elétrico.

4.2.1.2. Estabilidade da Espuma

A estabilidade da espuma foi analisada através da variação do seu volume ao longo do tempo. Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar o efeito da metodologia de agitação, do tipo de surfactante, da sua concentração e da adição de um estabilizador de espuma.

Na Figura 21 encontram-se representados os resultados referentes à estabilidade das espumas do surfactante *Pluronic F127* (com e sem a adição do agente estabilizador) para as diferentes concentrações de surfactante, obtidas a partir do método *syringe-foaming*.

Metodologia Syringe-Foaming

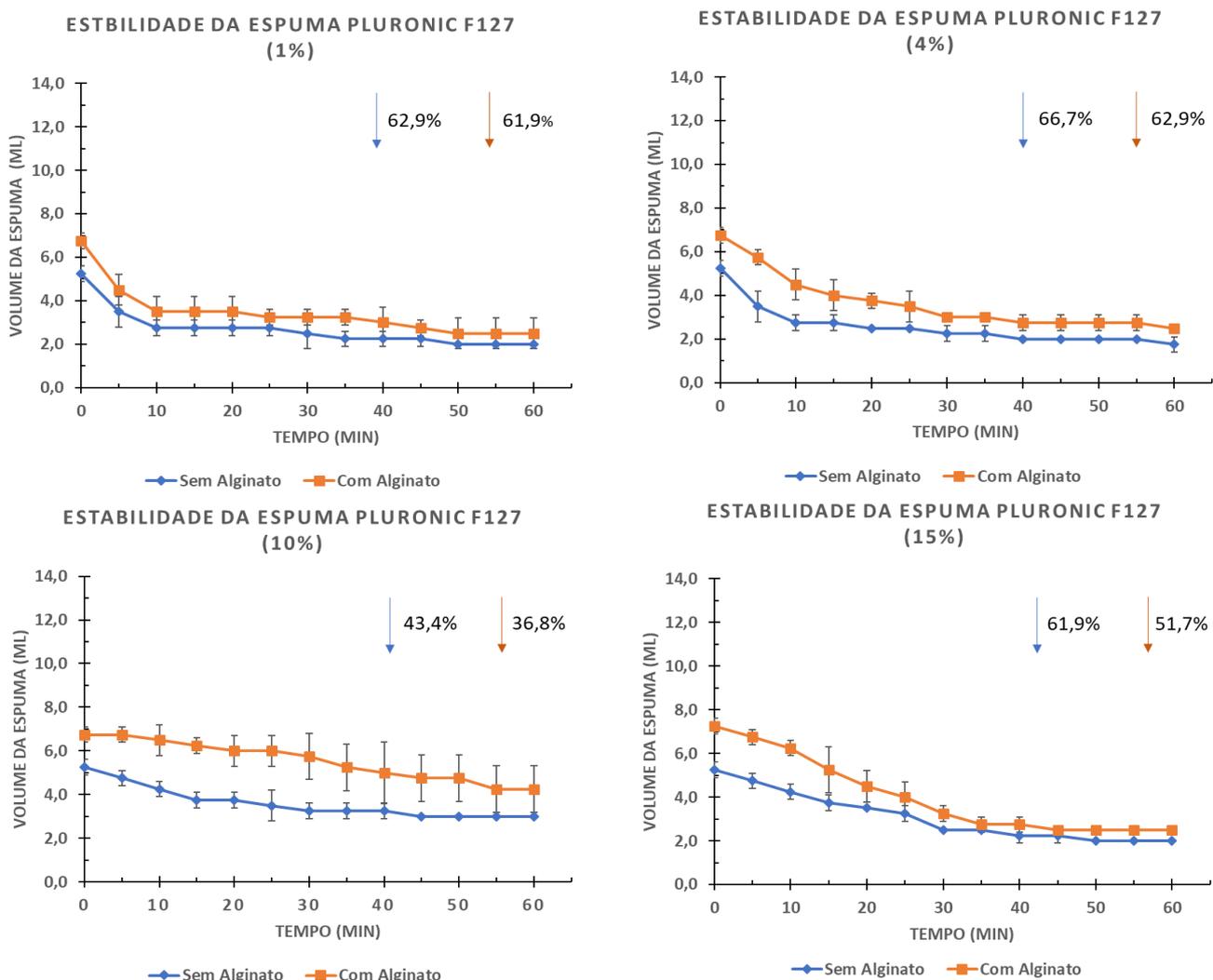


Figura 21: Resultados de estabilidade da espuma obtidos para o surfactante *Pluronic F127* e recorrendo-se à metodologia de agitação via *syringe-foaming*.

De seguida, na Figura 22 encontram-se representados os resultados obtidos para os ensaios de estabilidade das espumas do surfactante *Pluronic F127* obtidas através do instrumento de agitação elétrica.

Metodologia Instrumento de Agitação Elétrica

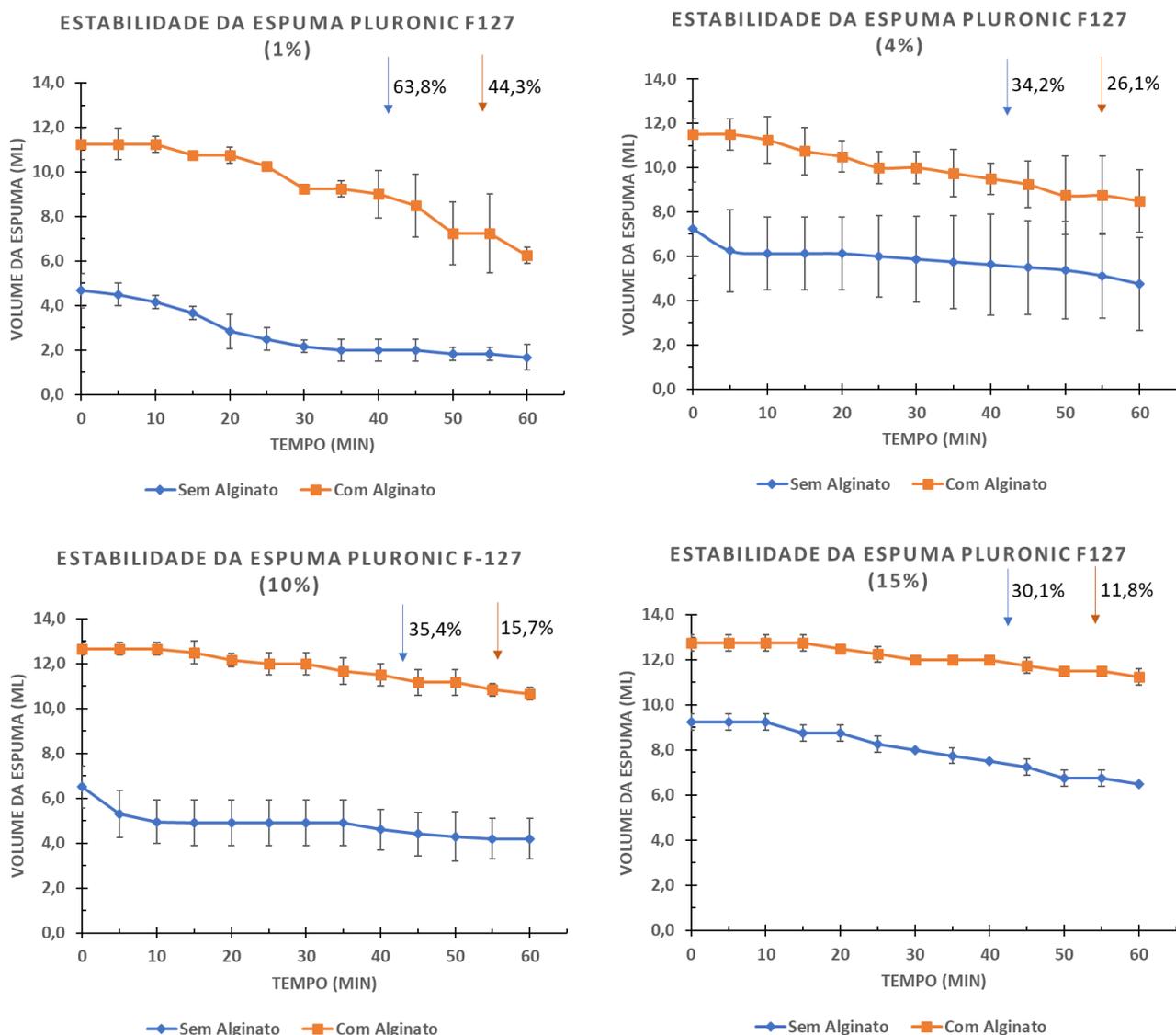


Figura 22: Resultados de estabilidade da espuma obtidos para o surfactante *Pluronic F127* recorrendo-se a um instrumento de agitação elétrica.

Através dos resultados obtidos verificou-se um decaimento progressivo do volume da espuma. Para a metodologia *syringe-foaming*, o decaimento máximo, na ordem dos 66,7 %, foi obtido para a espuma obtida a partir da solução de concentração do surfactante de 4 % (m/v) sem a adição de alginato. Por sua vez, a espuma que apresentou maior estabilidade, apresentando uma perda volúmica de 51,7 % foi a espuma obtida a partir da concentração de 15 % (m/v) com adição de alginato.

Tal como para o método *syringe-foaming*, com o uso do instrumento de agitação elétrica verificou-se um decaimento progressivo do volume da espuma, contudo, esse decaimento foi substancialmente menor. O decaimento máximo, na ordem dos 63,8 %, foi obtido para a espuma produzida a partir da solução de concentração do surfactante de 1 % (m/v) sem a adição de alginato. Por sua vez, a espuma que demonstrou maior

estabilidade, apresentando uma perda de espuma de 11,8 % foi a espuma obtida a partir da concentração de 15 %(m/v) com adição de alginato.

Após a análise das espumas do surfactante obtidas a partir do *Pluronic F127*, prosseguiu-se então para o estudo da estabilidade das espumas do surfactante *Tween80*.

Na Figura 23 encontram-se representados os resultados referentes à estabilidade das espumas do surfactante *Tween80* obtidas a partir do método *syringe-foaming*.

Metodologia Syringe-Foaming

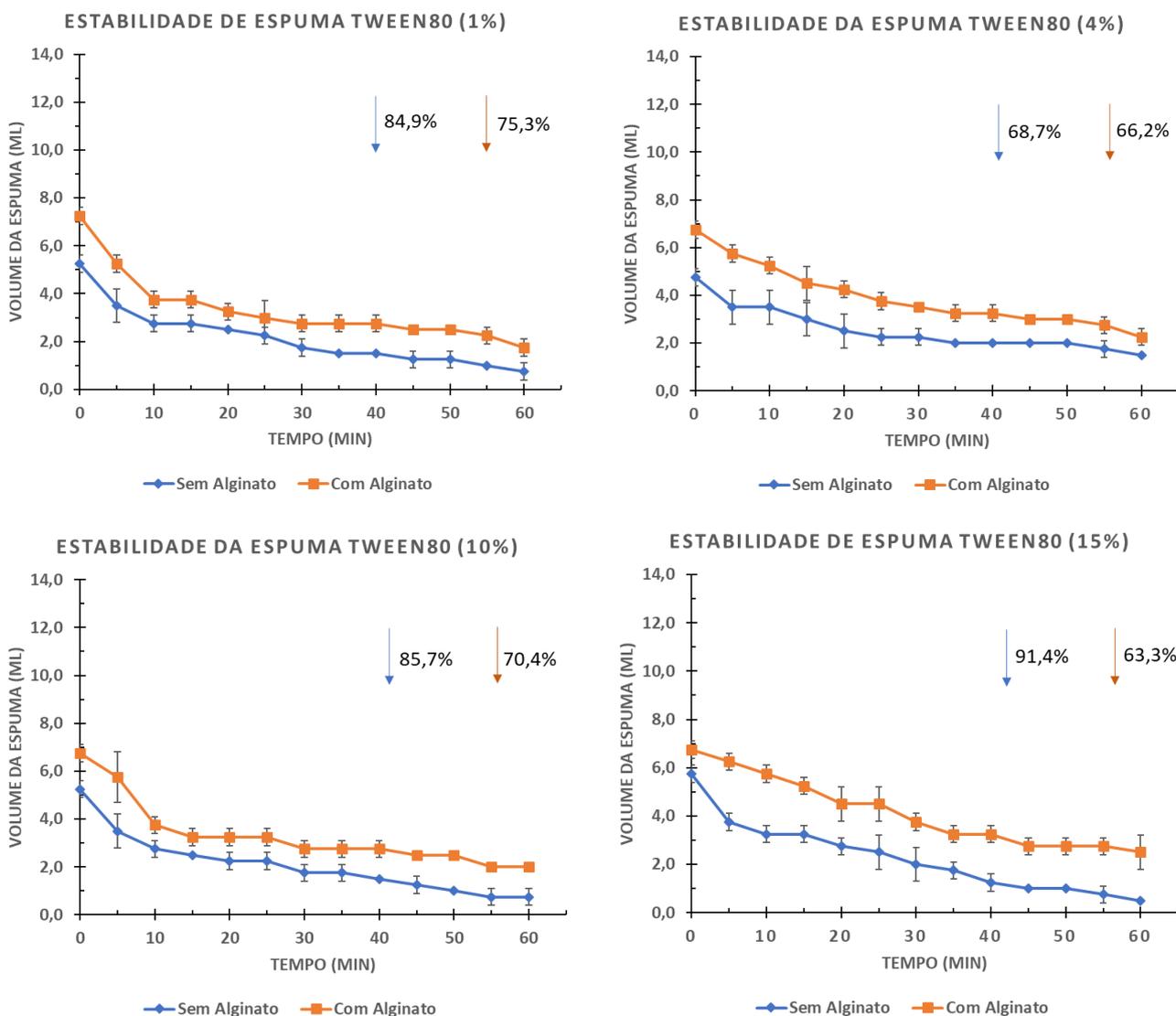


Figura 23: Resultados de estabilidade da espuma obtidos para o surfactante *Tween80* e recorrendo-se à metodologia de agitação via *syringe-foaming*.

De seguida, na Figura 24, encontram-se representados os resultados obtidos referentes às espumas do *Tween80* produzidas a partir do instrumento de agitação elétrico.

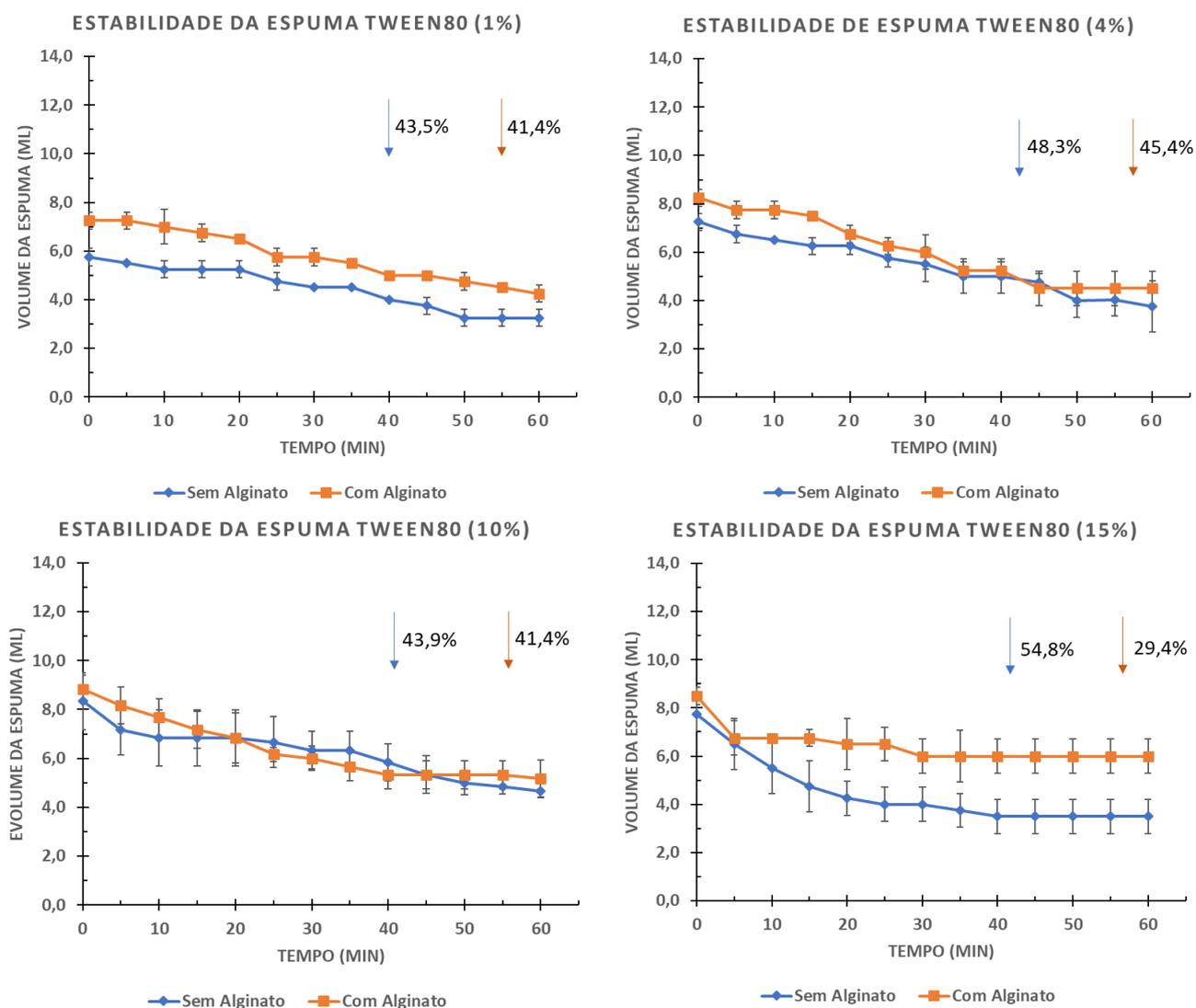
Metodologia Instrumento de Agitação Eléctrico

Figura 24: Resultados de estabilidade da espuma obtidos para o surfactante *Tween80* e recorrendo-se à metodologia de agitação via uso de um instrumento de agitação eléctrico.

Tal como para o *Pluronic F127*, para o surfactante *Tween80*, verificou-se uma perda de volume da espuma ao longo do tempo. Para a metodologia *syringe-foaming*, o valor de perda máximo, correspondente a 91,4 %, foi observado para a espuma obtida a partir da solução de concentração de 15 % sem adição de alginato. Contrariamente, a espuma com menor perda de volume (63,2 %) foi a produzida a partir da concentração do surfactante de 15 % com adição de alginato.

Por sua vez, para a metodologia via uso de um instrumento de agitação eléctrico, a espuma do surfactante *Tween80* mais estável corresponde à produzida a partir da solução de concentração 15 % com adição de alginato, cujo decaimento durante a hora analisada correspondeu a 29,4 %. Contrariamente, a espuma com menor capacidade de manutenção das suas propriedades ao longo do tempo corresponde à obtida a partir da concentração de 4 % sem adição de alginato, perdendo 54,8 % do seu volume total.

Para todas as espumas testadas constatou-se que a adição de alginato tem um efeito estabilizador da espuma, sendo esse efeito prevaemente para as espumas produzidas a partir do instrumento de agitação elétrico e para as espumas obtidas através das soluções do surfactante *Pluronic F127*.

Ao longo do tempo e a partir do momento da formação de uma espuma ocorrem três processos responsáveis pela sua perda volúmica: drenagem, coalescência das bolhas e rutura. A drenagem do líquido corresponde à perda do líquido que se encontra confinado às zonas interlamelares responsável pelo suporte estrutural das bolhas. Por sua vez, a coalescência das bolhas ocorre através da rutura das lamelas e difusão entre as bolhas. Desta forma, o aumento da viscosidade das zonas interlamelares será responsável pelo retardamento dos processos de destruição da espuma. A adição de alginato aumenta a viscosidade das zonas interlamelares e, conseqüentemente, a sua capacidade de deformação elástica, levando a um retardamento no processo de coalescimento, uma vez que as bolhas apresentam mais liberdade de forma. Este efeito, apesar de prevalecer para o surfactante *Pluronic F127*, também é visível para o *Tween80*, especialmente para a solução de concentração maior (15 %(m/v)).

Relativamente ao efeito da concentração da solução do surfactante na estabilidade da espuma os resultados não foram conclusivos. Contudo, seria espectável que ocorresse um aumento da estabilidade da espuma com o aumento da concentração, uma vez que o aumento do número de moléculas de surfactante presentes em solução levam a um aumento na viscosidade e à diminuição do tamanho das bolhas. No entanto, tal efeito só é significativo nas espumas produzidas a partir do *Pluronic F127* com recurso ao instrumento de agitação elétrico.

Através dos estudos da estabilidade da espuma, foi possível concluir que a metodologia de agitação que permite obter espumas mais estáveis ao longo do tempo é o instrumento de agitação elétrico. Para esta metodologia, a melhor formulação correspondeu à espuma obtida a partir do *Pluronic F127* (15 %(m/v)) com adição de alginato, cuja perda de volume foi de 11,8 %. Por sua vez, para a metodologia *syringe-foaming*, a espuma obtida que apresentou maior estabilidade foi a produzida com o *Pluronic F127* (10 %(m/v)) com adição de alginato, apresentando um decaimento do volume de 36,8 %. De notar, que se verificou uma diferença de 25 % em termos de perda volúmica entre as melhores formulações para cada metodologia.

Para continuação do trabalho, foram selecionadas as seguintes condições que oferecem melhores propriedades das espumas: espumas de concentrações de surfactante de 10 e 15 %(m/v), obtidas a partir do instrumento de agitação elétrico. Desta forma, essas foram as condições aplicadas para a análise das espumas líquidas cerâmicas e produção das esferas.

4.2.2. Propriedades da Espuma Líquida Cerâmica

A espuma líquida cerâmica consiste na mistura da espuma da solução do surfactante com uma suspensão cerâmica, previamente preparada e homogeneizada. Para estas espumas foram apenas realizados os ensaios de estabilidade da espuma, visto que a sua espumabilidade se encontra estritamente dependente das espumas da solução de surfactante base.

4.2.2.1. Estabilidade da Espuma

No âmbito do trabalho em estudo, o requisito da estabilidade da espuma da solução do surfactante interessa apenas até essa mesma espuma ser misturada com a suspensão cerâmica. Durante o procedimento experimental, houve o cuidado de minimizar ao máximo os tempos de espera da espuma da solução do surfactante, visto que para algumas das formulações ocorre um decaimento do seu volume na fase inicial após a sua formação.

Após a mistura da espuma da solução do surfactante com a suspensão cerâmica (pó de HAp misturado com alginato) é obtida uma pasta, dificultando tanto a drenagem do líquido quanto a difusão do gás entre as lamelas, contribuindo assim para a estabilização da espuma. De facto, similarmente à função do alginato como estabilizador da espuma, a incorporação de partículas sólidas apresenta, também, um efeito estabilizador. As partículas sólidas criam um filme denso ao redor das bolhas e nas zonas interlamelares, havendo um retardamento dos processos responsáveis pelo envelhecimento da espuma [75].

Os resultados obtidos para os ensaios da estabilidade da espuma líquida cerâmica encontram-se representados na Figura 25.

Através da análise dos dados, verificou-se que após 30 minutos da produção da espuma, o seu volume mantém-se igual ao volume inicial. A produção das esferas a partir de uma seringa com a espuma líquida cerâmica tem duração de cerca de 10 minutos, pelo que é assegurada a manutenção da integridade e estabilidade da espuma líquida cerâmica durante o processo produtivo.

Por sua vez, as variações relativas aos valores do volume vão de encontro às variações da capacidade de formação da espuma da solução do surfactante.

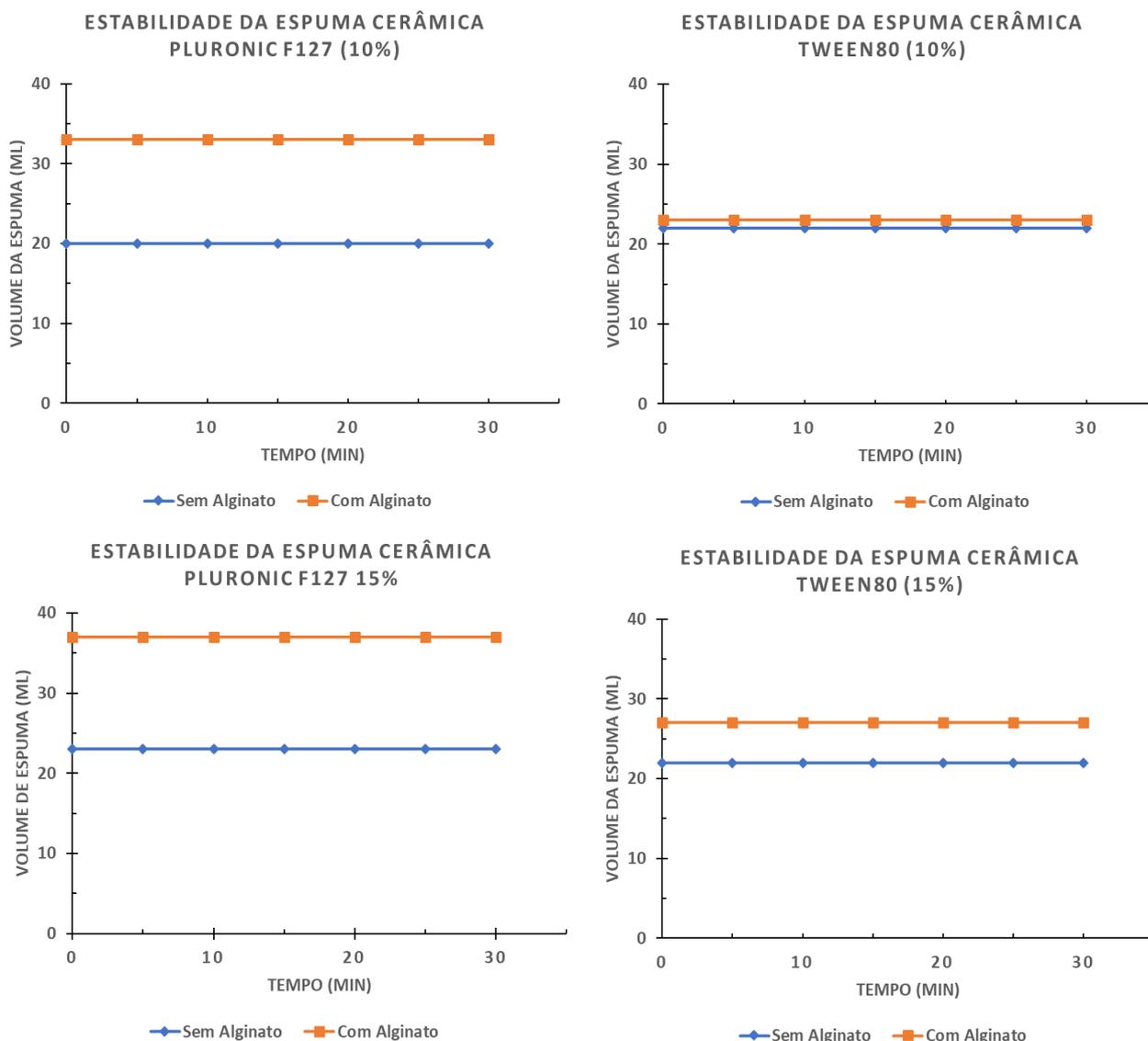


Figura 25: Resultados da espumabilidade das espumas líquidas cerâmicas.

4.3. Produção das Esferas

A produção das esferas foi realizada com recurso a um sistema de injeção controlada da espuma líquida cerâmica. Para assegurar o bom desempenho do sistema, a força motriz que modera a injeção da espuma deve ser mensurável e estável. A força motriz utilizada foi a pressão através do uso de uma bomba infusora. Desta forma, a produção das esferas foi realizada injetando-se a espuma através de uma peça com secção circular, responsável pela atribuição de uma forma esférica à espuma.

Na Figura 26 a) e b) encontram-se representadas imagens das esferas produzidas através da metodologia *syringe-foaming* e através do instrumento de agitação elétrico, respetivamente, obtidas a partir da mesma formulação.

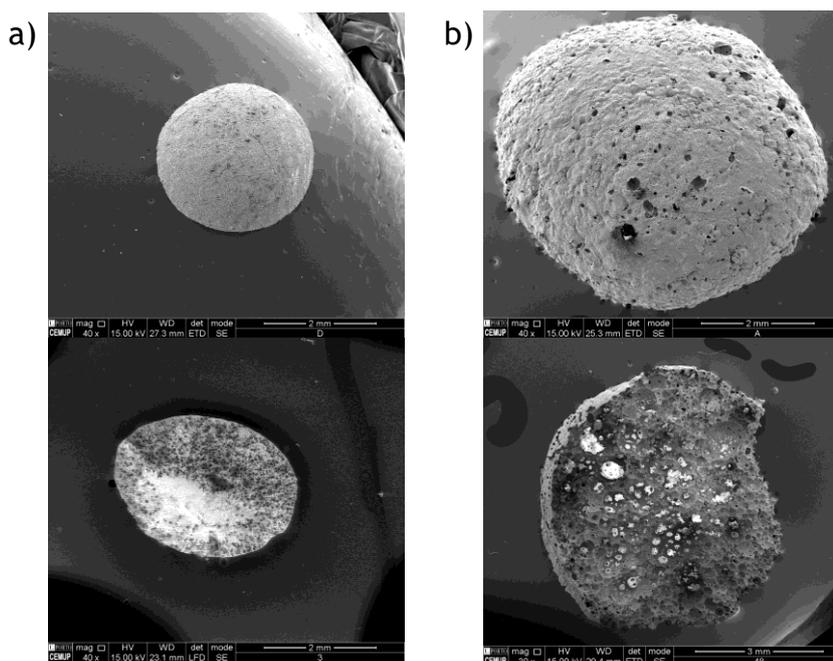


Figura 26: Estrutura interna e externa das esferas obtidas através da produção de espumas a) via metodologia *syringe-foaming* e b) via uso de um instrumento de agitação elétrico.

Através da análise das imagens, é possível concluir que ambas as metodologias de agitação permitem a obtenção de porosidade nas esferas. Contudo, verificou-se que a metodologia empregue na produção das esferas tem um efeito indubitável não só no tamanho das esferas, como também na sua porosidade. O aumento significativo da porosidade quando se utiliza o instrumento de agitação elétrico está relacionado com a quantidade de ar incorporada no processo de formação da espuma e com a estabilidade da mesma. Desta forma, as imagens são concordantes com os resultados de espumabilidade obtidos anteriormente, uma vez que o instrumento de agitação elétrico permite uma maior incorporação de ar, obtendo-se, conseqüentemente, esferas maiores e com maior nível de porosidade.

Por sua vez, o aumento do tamanho das esferas está relacionado com a metodologia de produção das esferas e com a reologia da espuma líquida cerâmica. Aquando a produção das esferas, o descolamento das mesmas da peça utilizada não é instantâneo. Durante um determinado estágio a gotícula mantém-se na extremidade da peça crescendo em tamanho. A duração desse estágio depende da viscosidade da espuma, sendo que para viscosidades maiores o estágio é mais longo, traduzindo-se num aumento do tamanho da gota. De salientar, que a viscosidade da espuma depende da quantidade de ar incorporado na mesma: quanto maior for o teor de gás presente maior será a sua viscosidade. De seguida, ocorre um rompimento do fluxo formando-se uma esfera e recomeça o processo formando-se o novo núcleo da próxima gota.

Adicionalmente, outro parâmetro importante é a porosidade superficial das esferas. A porosidade superficial irá permitir a penetração de biofluidos e vasos sanguíneos. A vascularização óssea não só fornece nutrientes essenciais para a sobrevivência do tecido, mas também desempenha um papel crucial na coordenação da atividade das células ósseas

de forma a possibilitar a regeneração óssea. Através da imagem, é possível verificar que a amostra produzida através do instrumento de agitação elétrico apresenta um maior nível de porosidade à superfície.

Assim sendo, o uso do instrumento de agitação elétrico mostrou-se a metodologia mais eficaz na obtenção de espumas estáveis e com boa capacidade de formação da espuma, permitindo a obtenção de porosidades mais adequadas ao objetivo de trabalho. Por esse motivo, foi a metodologia adotada nos estudos que se seguem.

4.4. Caracterização das Esferas

4.4.1. Análise de Fases Cristalinas

Na Figura 27 encontra-se representado o espectro DRX correspondente à análise realizada ao pó obtido após a trituração das esferas sinterizadas. Esta análise foi realizada com o objetivo de verificar a cristalinidade e determinar as fases cristalinas presentes nas esferas cerâmicas.

Na Tabela 4 encontram-se representados os valores teóricos referentes aos picos de intensidade máxima das fases cristalográficas puras que podem estar presentes em materiais cerâmicos preparados a partir de fosfatos de cálcio. Estes dados são utilizados como padrão de forma a serem identificadas, através do espectro obtido, as fases cristalinas existentes.

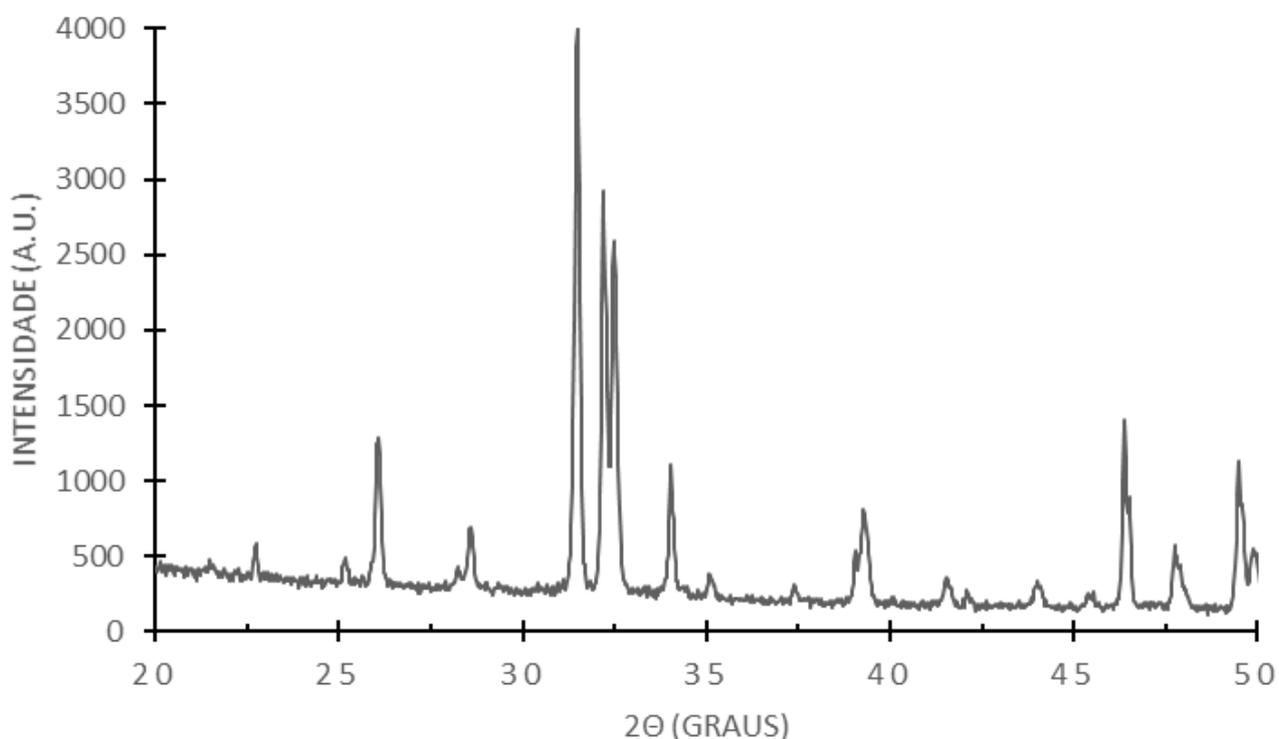


Figura 27: Espectro DRX das esferas cerâmicas sinterizadas.

Tabela 4: Dados teóricos referentes aos valores de 2θ para as intensidades máximas de diferentes fases cristalográficas.

<i>Fase Cristalográfica</i>	<i>Fórmula Química</i>	<i>Valor 2θ para a Intensidade Máxima</i>	<i>Arquivo ICDD n°</i>
<i>Hidroxiapatite (HAp)</i>	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	31,773	09-0169
<i>B - Fosfato de Tricálcio (β-TCP)</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	31,025	09-0169
<i>a - Fosfato de Tricálcio (α-TCP)</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	30,735	29-0359
<i>Óxido de Cálcio (CaO)</i>	CaO	37,360	48-1467

Através da análise e comparação do espectro com os dados referentes às fases cristalográficas puras possivelmente presentes nas esferas, foi possível constatar que as esferas são constituídas por hidroxiapatite de fase pura (superior a 99 %).

4.4.2. Efeito do Surfactante e do Agente Estabilizador de Espuma na Porosidade das Esferas

Durante a realização do tratamento térmico das esferas produzidas, toda a matéria orgânica é eliminada, nomeadamente, o alginato e o surfactante, conferindo-se, desta forma, uma estrutura porosa ao material cerâmico sinterizado final.

A topografia/morfologia da estrutura interna das esferas sinterizadas foi observada recorrendo-se a microscopia eletrónica de varrimento. Desta forma, foi recolhido um conjunto de micrografias das esferas produzidas com as diferentes formulações, permitindo avaliar a sua influência na microestrutura e porosidade das esferas produzidas.

As variáveis das formulações cerâmicas em estudo foram: o tipo de surfactante, a sua concentração, o seu volume, a adição de um estabilizador de espuma e o tempo de agitação das espumas. Desta forma, as concentrações utilizadas para ambos surfactantes, corresponderam a 10 e 15 % (m/v), uma vez que se mostraram ser as concentrações mais vantajosas a nível da qualidade das espumas. Por sua vez, os tempos de agitação testados foram 10 e 20 segundos.

Numa primeira fase serão analisadas as formulações referentes ao surfactante *Pluronic F-127*, sendo de seguida analisadas as amostras produzidas a partir do surfactante *Tween80*. Por fim, será realizada uma análise comparativa entre ambos os surfactantes.

Na Figura 28 e 29 encontram-se representadas as micrografias das estruturas internas das esferas, referentes às amostras produzidas através das soluções de concentrações do surfactante *Pluronic F-127* de 10 e 15 % (m/v), respetivamente.

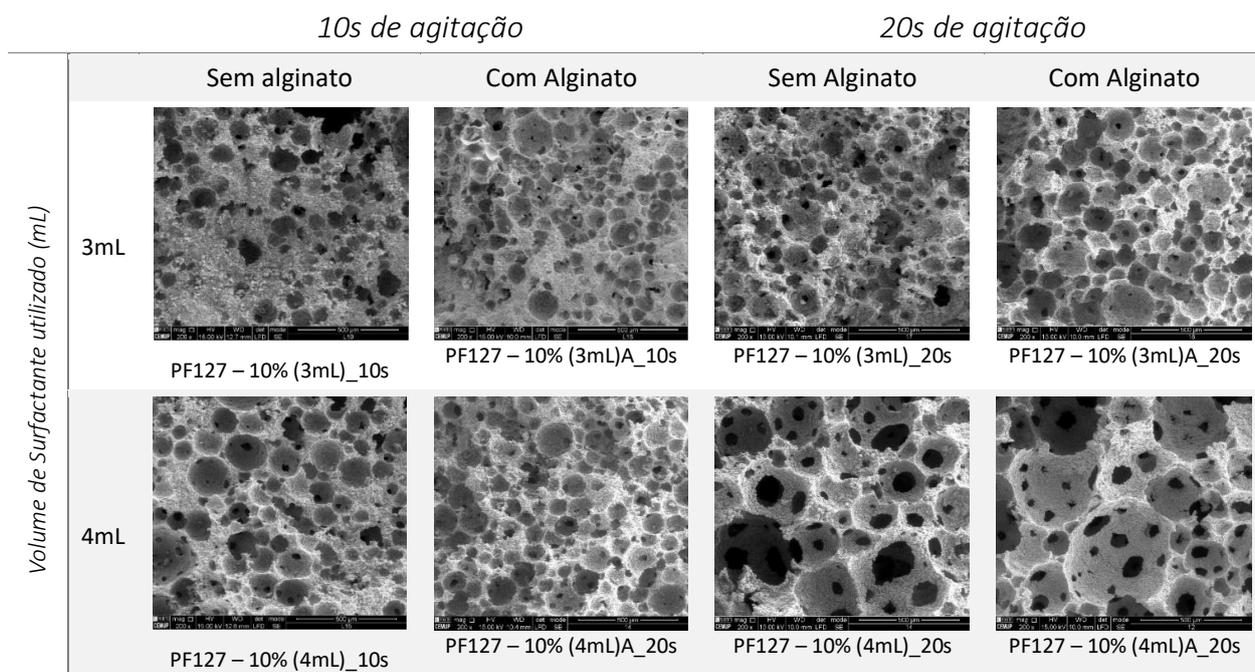


Figura 28: Micrografias das estruturas internas das esferas, referentes às amostras produzidas através da solução de concentração do surfactante *Pluronic F-127* de 10 (m/v).

Comparando as amostras obtidas a partir das duas concentrações diferentes, pode observar-se que para as mesmas condições, as amostras produzidas a partir da solução a 10 % apresentam uma porosidade mais interconetiva e com maior tamanho de poro, comparativamente com as amostras produzidas a partir da concentração de 15 % de surfactante.

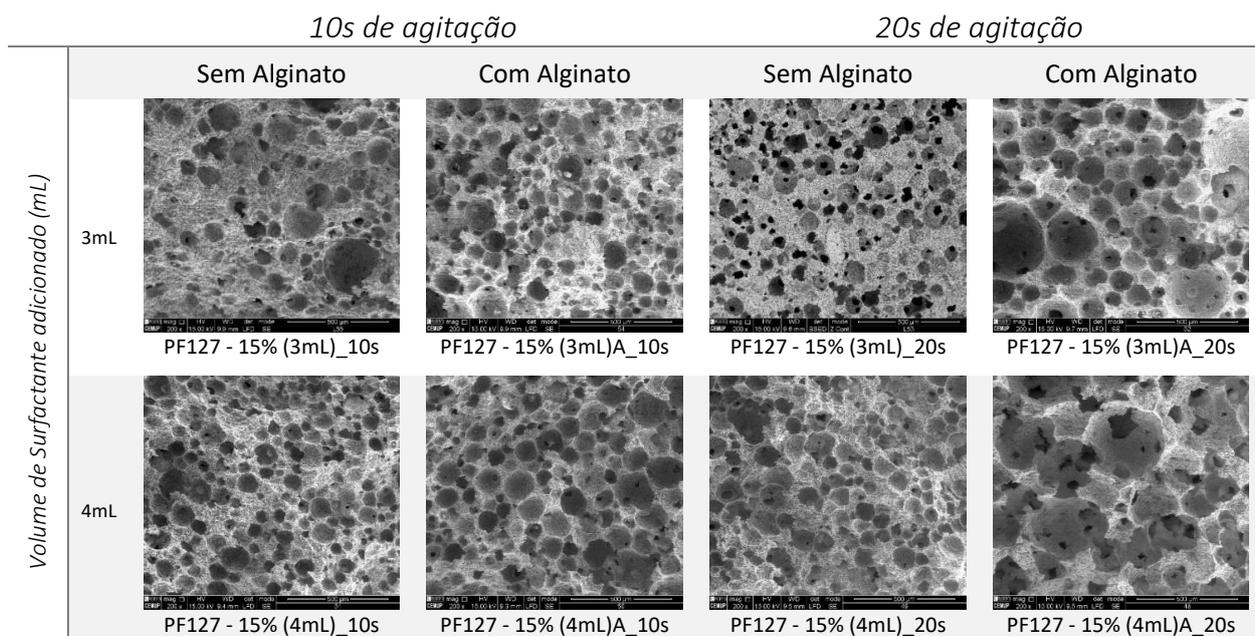


Figura 29: Micrografias MEV da estrutura interna das esferas, referentes às amostras produzidas a partir da solução de concentração do surfactante *Pluronic F-127* de 15 (m/v).

Para ambas as concentrações utilizadas, verificou-se, ainda, que as amostras produzidas com tempos de agitação da espuma de 20 segundos apresentam maiores níveis de interconectividade e tamanho de poro. Tempos de agitação maiores levam a uma maior incorporação de ar na estrutura e também a uma maior homogeneização da espuma, maximizando o papel do surfactante enquanto agente ativo. Desta forma, o tempo de agitação mais adequado de acordo com os objetivos do trabalho corresponde a 20 segundos, pelo que foi o tempo de agitação adotado para a produção das esferas cerâmicas porosas obtidas a partir do surfactante *Tween80*.

Na Figura 30 encontram-se representadas as micrografias das estruturas internas das esferas, referentes às amostras produzidas através das soluções de concentrações do surfactante *Tween80* de 10 e 15 %(m/v), respetivamente.

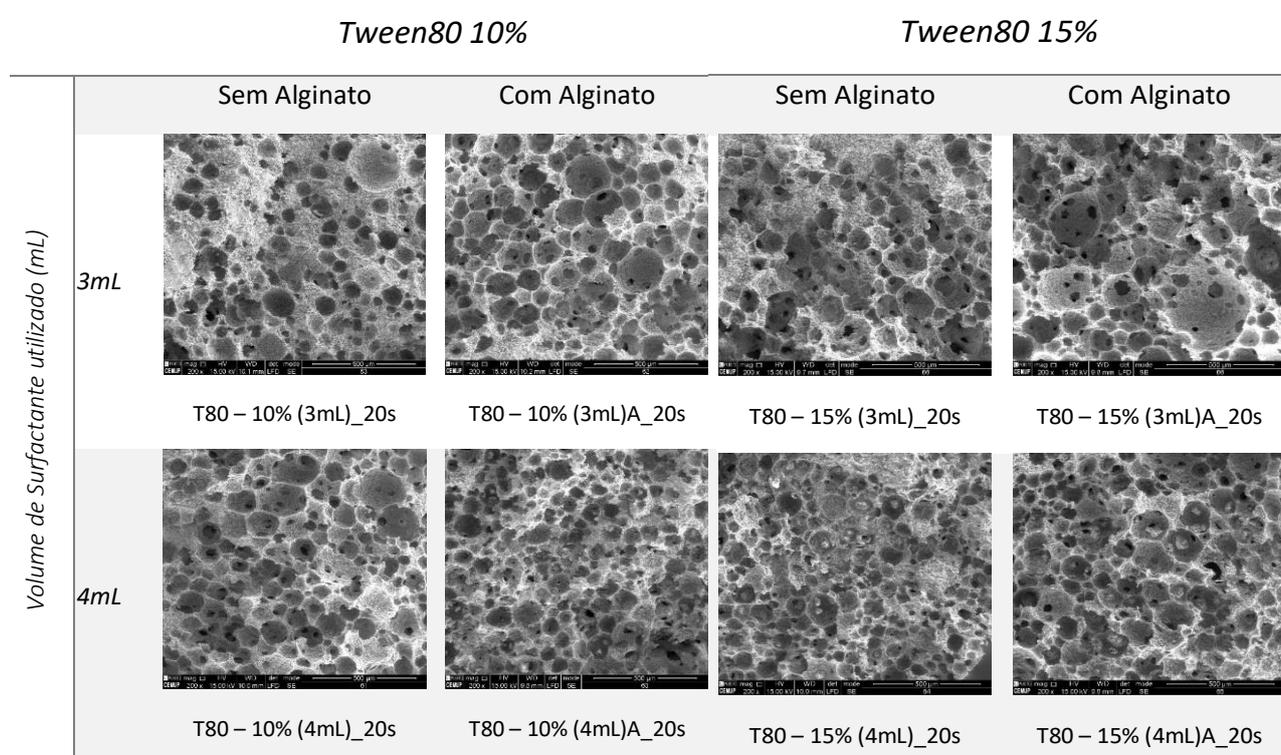


Figura 30: Micrografias MEV da estrutura interna das esferas, referentes às amostras produzidas através da solução de concentração do surfactante *Tween80* de 10 %(m/v).

Ambos os surfactantes possibilitaram a produção de esferas com níveis de porosidade e interconectividade satisfatórios.

Através das imagens é possível observar que o aumento do volume de surfactante traduz-se numa diminuição das zonas densas da esfera (zonas sem qualquer porosidade). Contudo, o seu efeito no tamanho dos poros não é conclusivo. Enquanto que para o *Pluronic F127* ocorre um aumento do tamanho dos poros, para o *Tween80* o efeito aparenta ser contrário. De facto, o *Pluronic F127* apresenta maior espumabilidade do que o *Tween80* e, por sua vez, a espumabilidade afeta a quantidade de ar incorporada e,

consequentemente, o tamanho dos poros (quanto maior a quantidade de ar incorporado nas espumas, maiores serão os poros obtidos). De salientar que, apesar de para o *Tween80* o aumento do volume de surfactante conduzir a uma diminuição do tamanho dos poros, esse efeito não afetou negativamente a interconectividade. Para ambos os surfactantes, verificou-se que o aumento do volume leva, então, a um aumento da interconectividade dos poros, sendo esse efeito mais significativo para as amostras sem alginato.

Relativamente à concentração do surfactante, e com base nas micrografias MEV, verificou-se que para o surfactante *Tween80* os melhores níveis de porosidade, tamanho de poro e sua interconectividade foram obtidos para a concentração de 15 %(m/v). Contrariamente, para o *Pluronic F127* os melhores resultados foram obtidos para a concentração de 10 %(m/v).

Por sua vez, a adição do estabilizador de espuma, apresentou o mesmo efeito para ambos os surfactantes, demonstrando um efeito significativo na porosidade das esferas cerâmicas. Esse efeito consistiu na diminuição das zonas densas, no aumento do tamanho de poros e interconectividade. Tal como referido anteriormente, o agente estabilizador de espuma utilizado foi um hidrogel, nomeadamente o alginato. A seleção deste hidrogel deveu-se ao procedimento de produção das esferas. Após a sua produção, as esferas são imersas numa solução de cloreto de cálcio responsável pela reticulação do alginato previamente incorporado na suspensão cerâmica. Desta forma, o uso de alginato enquanto estabilizador de espuma foi projetado com o objetivo de que o processo de reticulação auxiliasse a estabilização da espuma. Desta forma, expectou-se que, para além de o hidrogel aumentar a viscosidade e resistência das barreiras e zonas interlamelares da espuma, a sua reticulação intensifica-se esse aumento, contribuindo para um retardamento do colapso da espuma. Assim sendo, pode concluir-se que esse efeito foi alcançado, uma vez que as amostras sem alginato, na generalidade, apresentam zonas densas e porosidades baixas com tamanho de poro pequeno, muito provavelmente porque no decorrer do tempo de reticulação das esferas (12 horas), as espumas foram-se degradando e as bolhas colapsando. Na Figura 31 a) e b), encontram-se representadas imagens de esferas antes e após do processo de reticulação, sem e com a adição de alginato à espuma como agente estabilizador, respetivamente. Através da análise das imagens, é possível comprovar o efeito referido anteriormente.

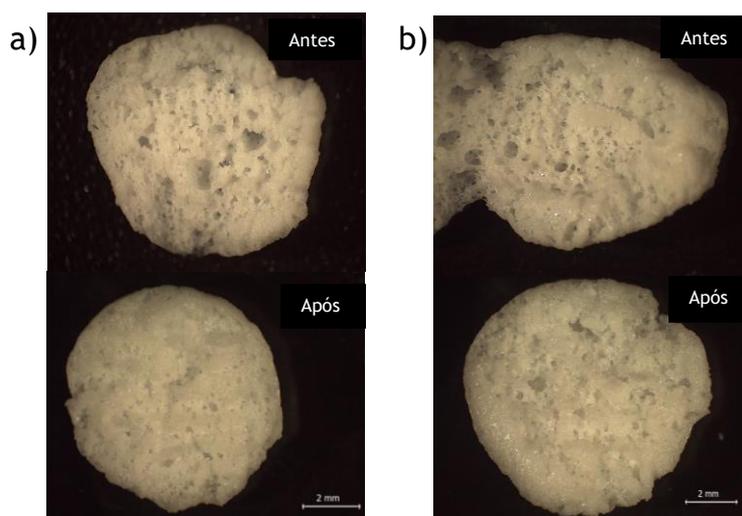


Figura 31: Imagens de esferas antes e após do processo de reticulação a) sem e b) com a adição de alginato à espuma como agente estabilizador.

4.4.3. Efeito da Viscosidade da Espuma Líquida Cerâmica na Forma das Esferas

Um dos requisitos essenciais a ter em consideração na realização deste trabalho, foi a obtenção de formas esféricas durante o processo de produção. Usualmente, os substitutos ósseos usados para o preenchimento de um defeito são comercializados sob a forma de cubos, grânulos, pós, entre outros. Um dos problemas relacionados com estas formas geométricas é o empacotamento dos seus compostos quando aplicado no local de implantação. Este empacotamento muito elevado irá impedir a circulação de fluídos e a vascularização óssea, comprometendo o papel do substituto no processo de regeneração do tecido ósseo.

De facto, ao projetar-se um substituto constituído por um conjunto de esferas dispersas entre si, é garantida uma porosidade interesférica. Isto deve-se ao facto de a forma esférica promover menos pontos de contacto entre as esferas adjacentes, limitando o grau de empacotamento entre si e permitindo a presença de uma rede de espaços vazios interconectados que permitem a difusão de fluídos e células. Desta forma, para além da intraporosidade (proporcionada no interior da esfera), haverá um outro nível de interporosidade (proporcionado pelas reduzidas zonas de contacto entre as esferas).

Contudo, de forma a possibilitar a obtenção da forma desejada houve alguns parâmetros a ter em consideração durante o procedimento de produção das esferas, nomeadamente, o fluxo do caudal estipulado no equipamento de infusão e a altura de queda das esferas na solução de cloreto de cálcio. Porém, a reologia da espuma líquida cerâmica é um fator preponderante na forma final obtida, sendo que, para viscosidades maiores haverá uma maior deformação das estruturas produzidas aquando a sua imersão na solução de cloreto de cálcio por efeito da tensão superficial da solução.

De notar que, tal como referido anteriormente, a viscosidade das espumas líquidas cerâmicas depende do teor de ar incorporado na espuma, sendo que quanto maior a quantidade de gás presente, maior a viscosidade. De salientar que, tal como comprovado

nos ensaios das propriedades das espumas, para concentrações de surfactante maiores, ocorre uma maior retenção de gás na espuma. Consequentemente, para concentrações maiores de surfactante é, então, esperada a obtenção de espumas com maiores níveis de viscosidade. Adicionalmente, a adição do agente estabilizador de espuma leva também a um aumento da viscosidade. Assim sendo, as formulações em que a reologia da espuma líquida cerâmica afetou mais drasticamente a forma das estruturas cerâmicas finais, foram as realizadas a concentrações de *Pluronic F127* de 15%(m/v) com adição do agente estabilizador de espuma.

As esferas produzidas a partir dessa formulação apresentaram uma forma oval acentuada. De forma a contornar este problema procedeu-se a uma tentativa de diminuir a tensão superficial da solução de cloreto de cálcio para a redução do efeito de queda. Para tal, foi realizada uma adição progressiva de etanol à solução de cloreto de cálcio (uma vez que se trata de uma solução volátil) [62]. O efeito do etanol foi significativo tal como se pode conferir na Figura 32. As estruturas cerâmicas passaram de uma forma oval para formas mais esféricas.

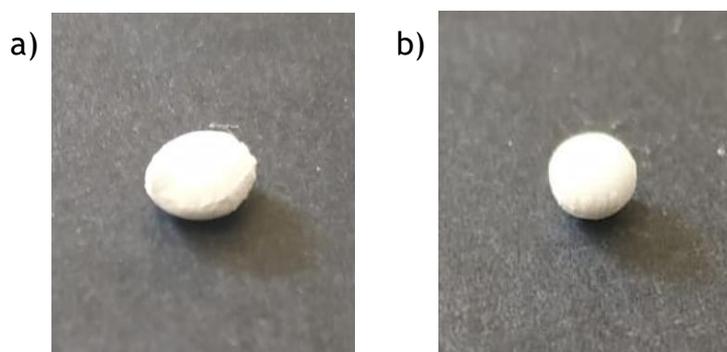


Figura 32: Estruturas cerâmicas obtidas a) sem adição de etanol e b) com a adição de etanol à solução de cloreto de cálcio.

4.4.4. Propriedades das Esferas

4.4.4.1. Determinação da Densidade

A densidade da HAp que constitui as esferas após sinterização foi obtida através do ensaio de picnometria de hélio. Desta forma, o valor de densidade obtido foi de $3,1723 \pm 0,0035 \text{ g/cm}^3$.

4.4.4.2. Teor de Porosidade e Resistência ao Esmagamento

Na Tabela 3 encontram-se representados os resultados obtidos referentes à porosidade (aberta, fechada e total) e aos ensaios de resistência ao esmagamento realizados.

Um material poroso pode apresentar poros fechados (isolados) e/ou poros abertos (interconectivos). A porosidade aberta caracteriza-se pela sua elevada interconectividade que permite a acessibilidade de gases e líquidos através da estrutura tridimensional do enxerto. Desta forma, a interligação de poros fornece caminhos para a invasão de

biofluidos e vasos sanguíneos. A vascularização óssea não só fornece nutrientes essenciais para a sobrevivência do tecido, mas também desempenha um papel crucial na coordenação da atividade das células ósseas e a sua migração para a remodelação óssea. Consequentemente, é essencial um substituto ósseo apresentar porosidade interconetiva.

Contudo, altos níveis de macroporosidade e interconectividade diminuem significativamente a resistência das esferas, uma vez que leva a um aumento das zonas de concentração de tensões, afetando a estabilidade e integridade estrutural da esfera.

Através dos resultados obtidos, é possível observar que os valores de resistência ao esmagamento obtidos são concordantes com a porosidade aberta e global das esferas. Para as esferas com maiores percentagens de porosidade aberta, verificou-se menores valores de resistência ao esmagamento. O valor de resistência mínimo obtido corresponde a $8,9 \pm 0,9$ N para uma porosidade total de 95,90 %, sendo 82,23 % aberta. Estes valores correspondem à formulação *PF127-10% (3mL)A_20s*, estando concordantes com a micrografia da estrutura interna da esfera, analisada anteriormente. Por sua vez, o maior valor de resistência ao esmagamento obtido correspondeu a $43,3 \pm 3,9$ N, para uma porosidade total de 52,68 % (31,36 % aberta). Esta formulação correspondeu à formulação *PF127-15% (3mL)_10s*.

De notar, que as amostras obtidas a partir do surfactante PF127 com tempos de agitação de 10 segundos, não apresentam resultados conclusivos. Desta forma, constatou-se que o tempo de agitação de 10 segundos é insuficiente para obtenção de uma estrutura homogênea, parametrizada e reproduzível.

Para o tempo de agitação de 20 segundos verificou-se que, na generalidade, os valores de porosidade aumentam no seguinte sentido, salvo pequenas variações:

$$(3 \text{ mL})_{20s} < (4 \text{ mL})_{20s} < (3 \text{ mL})A_{20s} < (4 \text{ mL})A_{20s}$$

Por sua vez, a resistência ao esmagamento variou em sentido inverso.

O objetivo do trabalho consiste na projeção de esferas cerâmicas para formulação de um substituto ósseo destinado para ortopedia. Desta forma, o objetivo é a obtenção de uma formulação capaz de conjugar um nível de porosidade que permita a vascularização eficiente da estrutura interna, e uma resistência mecânica satisfatória. Assim sendo, foi calculado um critério de correlação entre a porosidade aberta (Pa) e a resistência ao esmagamento (Re). Quanto mais próximo de 1 se apresentar o valor deste critério, melhor a relação entre estas duas propriedades, constituindo uma combinação satisfatória de ambas as propriedades. Este critério foi considerado apenas para as formulações de tempo de agitação de 20 segundos.

Para o surfactante PF127 a formulação com melhor relação entre propriedades foi a *PF127-15% (3mL)_20s*, com o valor de Pa igual $49,62 \pm 2,62$ % e de Re igual a $26,3 \pm 5,60$ N. Por sua vez, para o surfactante T80 a melhor formulação correspondeu à *T80 - 15% (4mL)_20s*, apresentando uma porosidade aberta de $42,26 \pm 0,33$ % e uma resistência ao esmagamento de $32,3 \pm 2,3$ N.

Tabela 5: Resultados obtidos referentes ao teor de porosidade (aberta, fechada e total) e aos ensaios de resistência ao esmagamento.

<i>Formulações</i>	<i>Porosidade Aberta - Pa (%)</i>	<i>Porosidade Fechada (%)</i>	<i>Porosidade Total (%)</i>	<i>Resistência ao Esmagamento - Re (N)</i>	<i>Pa/Re</i>
<i>HAp - controlo</i>	-	-	-	91,9 ± 2,9	-
<i>PF127-10% (3mL)_10s</i>	35,17 ± 2,46	19,90 ± 3,09	55,08	36,9 ± 5,1	-
<i>PF127-10% (3mL)A_10s</i>	47,47 ± 4,78	15,61 ± 3,31	63,08	20,6 ± 1,1	-
<i>PF127-10% (4mL)_10s</i>	28,53 ± 1,03	28,32 ± 1,25	56,85	24,2 ± 2,7	-
<i>PF127-10% (4mL)A_10s</i>	51,19 ± 6,09	18,30 ± 1,41	69,49	30,1 ± 3,1	-
<i>PF127-10% (3mL)_20s</i>	58,01 ± 2,97	16,54 ± 2,09	74,54	19,9 ± 0,1	2,90
<i>PF127-10% (3mL)A_20s</i>	82,23 ± 1,21	13,66 ± 2,15	95,90	8,9 ± 0,9	9,27
<i>PF127-10% (4mL)_20s</i>	74,73 ± 3,68	11,09 ± 2,09	85,82	10,7 ± 1,8	6,9
<i>PF127-10% (4mL)A_20s</i>	74,32 ± 8,02	9,50 ± 2,11	83,82	12,1 ± 6,2	6,16
<i>PF127-15% (3mL)_10s</i>	31,36 ± 2,02	21,32 ± 1,58	52,68	43,3 ± 3,9	-
<i>PF127-15% (3mL)A_10s</i>	34,60 ± 3,49	17,45 ± 5,15	52,04	14,8 ± 0,9	-
<i>PF127-15% (4mL)_10s</i>	49,93 ± 1,65	21,45 ± 1,53	71,83	37,1 ± 0,3	-
<i>PF127-15% (4mL)A_10s</i>	82,12 ± 4,08	13,66 ± 3,85	95,78	28,6 ± 3,1	-
<i>PF127-15% (3mL)_20s</i>	49,62 ± 2,62	18,54 ± 2,35	68,16	26,3 ± 5,6	1,88
<i>PF127-15% (3mL)A_20s</i>	66,85 ± 4,24	13,05 ± 4,46	79,91	14,7 ± 0,2	4,55
<i>PF127-15% (4mL)_20s</i>	55,88 ± 3,04	17,26 ± 1,95	70,14	15,9 ± 0,9	3,51
<i>PF127-15% (4mL)A_20s</i>	77,66 ± 0,88	11,27 ± 1,02	88,93	13,2 ± 3,3	5,88
<i>T80 - 10% (3mL) _20s</i>	23,74 ± 0,77	24,11 ± 1,96	47,85	30,1 ± 0,8	0,78
<i>T80 - 10% (3mL)A_20s</i>	29,81 ± 5,74	29,10 ± 1,82	58,91	15,4 ± 0,2	1,93
<i>T80 - 10% (4mL) _20s</i>	36,60 ± 1,48	28,26 ± 0,90	64,86	19,3 ± 1,9	1,90
<i>T80 - 10% (4mL)A_20s</i>	43,10 ± 3,18	25,45 ± 2,61	68,46	14,2 ± 0,6	3,02
<i>T80 - 15% (3mL) _20s</i>	39,52 ± 1,27	22,56 ± 2,16	62,08	33,7 ± 1,7	1,17
<i>T80 - 15% (3mL)A_20s</i>	49,33 ± 2,15	23,76 ± 4,27	65,09	16,7 ± 0,6	2,94
<i>T80 - 15% (4mL) _20s</i>	42,26 ± 0,33	24,61 ± 0,11	66,87	32,3 ± 2,3	1,03
<i>T80 - 15% (4mL)A_20s</i>	53,38 ± 1,90	19,44 ± 3,60	72,82	14,1 ± 2,4	3,78

5. Conclusão

A técnica de formação de espumas permite a produção de estruturas cerâmicas macroporosas e interconectivas. Contudo, existem vários parâmetros que afetam as propriedades das espumas e, conseqüentemente, a morfologia interna das estruturas. As variáveis estudadas foram: a metodologia de agitação empregue, o tempo de agitação, o tipo de surfactante utilizado, a sua concentração, o seu volume e a utilização de um agente estabilizador da espuma.

Neste trabalho foram estudadas duas metodologias de agitação distintas: *syringe-foaming* e o uso de um instrumento de agitação elétrico. Através dos resultados obtidos verificou-se que a metodologia via uso de um instrumento de agitação elétrico se mostrou mais eficaz. Esta metodologia permitiu uma maior incorporação de ar aquando a formação da espuma e conseqüentemente, um maior nível de porosidade das esferas produzidas. Adicionalmente, para a metodologia via uso de um instrumento de agitação elétrico verificou-se que, tempos de agitação mais elevados possibilitam uma maior incorporação de ar na estrutura e uma maior homogeneização da espuma, possibilitando uma maior rentabilidade do surfactante.

Relativamente ao agente tensoativo, foram utilizados dois surfactantes distintos (*Pluronic F127* e *Tween80*). Para ambos os surfactantes, verificou-se que a concentração apresenta um papel determinante no tamanho das bolhas presentes nas espumas. Quanto maior a concentração, menor será o tamanho das bolhas. Conseqüentemente, seria de esperar que para concentrações maiores o tamanho dos poros fosse menor, visto que as bolhas constituem a base que irá dar origem aos poros na estrutura cerâmica final. Contudo, uma vez que as concentrações de surfactante utilizadas para a produção das esferas foram muito próximas, o seu efeito não apresentou diferenças significativas. Por sua vez, o aumento do volume de surfactante utilizado conduziu a uma diminuição das zonas densas (zonas sem porosidade) ao longo da estrutura interna das esferas.

O agente estabilizador de espuma utilizado (alginato) demonstrou, para ambos os surfactantes, aumentar a espumabilidade e estabilidade da espuma, sendo esse efeito dominante no caso do *Pluronic F127*. Conseqüentemente, as esferas produzidas com recurso ao uso de alginato como agente estabilizador, demonstraram um aumento da taxa de poros, e também, um aumento do seu tamanho e interconectividade.

De notar que o processo de produção de esferas utilizado e a viscosidade da espuma líquida cerâmica afetam a forma final das esferas obtidas. Desta forma, é necessário ter em consideração um conjunto de parâmetros que devem ser controlados, nomeadamente, a velocidade do fluxo do caudal imposta através da bomba infusora e a altura a que as esferas caem na solução de cloreto de cálcio. Adicionalmente, a elevada tensão superficial da solução também é um fator contributivo para a deformação das esferas. Contudo, este efeito pode ser anulado através do uso de etanol.

Apesar de o *Pluronic F127* apresentar um melhor desempenho a nível de qualidade das espumas, comparativamente com o *Tween80*, contudo, as esferas que possuem uma melhor relação entre propriedades físicas e mecânicas foram as obtidas a partir do *Tween80*.

6. Trabalhos Futuros

Apesar do objetivo do presente trabalho ter sido alcançado com sucesso, ainda há um conjunto de ideias e ensaios a serem testados.

Numa primeira etapa seria interessante testar o encapsulamento de agentes terapêuticos no interior das esferas produzidas. Biocerâmicos com propriedades osteocondutoras e regenerativas têm vindo a ganhar grande atenção no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, uma vez que podem combinar a capacidade de regeneração do tecido ósseo com a capacidade de desempenhar um papel terapêutico local, evitando a ocorrência de toxicidade sistémica ou desenvolvimento de resistência a fármacos, contrariamente ao que ocorre com administrações sistémicas. Desta forma, uma vez que as esferas produzidas apresentam um nível de porosidade, tanto interna como à superfície, satisfatório, possivelmente as suas estruturas apresentam a capacidade de transportar fatores de crescimento (para induzir o crescimento tecidual) ou fármacos (para o tratamento de patologias e infeções). Os fármacos mais indicados para incorporação nas esferas seriam agentes antibacterianos (de forma a reduzir as infeções e a carga bacteriana no local da implantação), visto que, um dos problemas mais recorrentes associado à implantação de um substituto ósseo é a ocorrência de infeções.

Adicionalmente, de forma a otimizar o carregamento dos fármacos, a produção das esferas poderá ainda ser otimizada para a obtenção de esferas ocas. Idealmente, o núcleo da esfera apresentará a capacidade de encapsular fármacos e fornecer a sua proteção contra compostos biológicos que podem interferir na disponibilidade do medicamento. Para além disso, o núcleo oco poderá oferecer melhor eficiência de carregamento e uma libertação mais prolongada e controlada do medicamento.

Referências Bibliográficas

- [1] S. Langstaff, M. Sayer, T. J. N. Smith, and S. M. Pugh, "Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response", *Biomaterials*, vol. 22, no. 2, pp. 135-150, 2001.
- [2] P. Lichte, H. C. Pape, T. Pufe, P. Kobbe, and H. Fischer, "Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence", *Injury*, vol. 42, no. 6, pp. 569-573, 2011.
- [3] F. Baino, G. Novajra, and C. Vitale-Brovarone, "Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering", *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 3, pp. 202-202, 2015.
- [4] T. W. Bauer and G. F. Muschler, "Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science," *Clinical Orthopaedics and Related Research*", vol. 371, pp. 10-27, 2000.
- [5] D. P. A. Seth Greenwald, (Oxon); Scott D. Boden, M.D.; Victor M. Goldberg, M.D.; Yusuf Khan, M.S.; Cato T. Laurencin, M.D., Ph.D.; Rnady N. Rosier, M.D., "BONE GRAFT SUBSTITUTES: FACTS, FICTION & APPLICATONS", American Academy Of Orthopaedic Surgeons, The Journal of Bone and Joint Surgery, 2003.
- [6] A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, and N. Maffulli, "Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions", (in eng), *Journal of orthopaedic surgery and research*, vol. 9, no. 1, pp. 18-18, 2014.
- [7] W. a. M. J. L. Duan, E. S. F. Edition), Ed. "*Chapter 78 - Bone Grafts and Bone Replacements*". W.B. Saunders, 2019.
- [8] M. Gutierrez, M. A. Lopes, N. S. Hussain, A. T. Cabral, L. Almeida, and J. D. Santos, "Substitutos Ósseos : conceitos gerais e estado actual", *Arquivos de Medicina*, vol. 19, pp. 153-162, 2005.
- [9] A. S. R. Moreira, "Substitutos ósseos: uma comparação", Mestre em Medicina Dentária, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.
- [10] J. L. Drury and D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications", *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4337-4351, 2003.
- [11] U. Heise, J. F. Osborn, and F. Duwe, "Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute", *International Orthopaedics*, vol. 14, no. 3, pp. 329-338, 1990.
- [12] x. Wang, J.-M. Ruan, and Q.-Y. Chen, "*Effects of surfactants on the microstructure of porous ceramic scaffolds fabricated by foaming for bone tissue engineering*", pp. 1275-1279. 2009
- [13] S. K. Sarkar and B. T. Lee, "Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials", *The Korean journal of internal medicine*, vol. 30, no. 3, pp. 279-293, 2015.
- [14] A. F. Vásquez, S. Domínguez, and L. A. Loureiro dos Santos, "α-TCP cements prepared by syringe-foaming: Influence of Na₂HPO₄ and surfactant concentration", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 81, pp. 148-155, 2017.
- [15] E. B. Montufar *et al.*, "Foamed surfactant solution as a template for self-setting injectable hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration", *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 3, pp. 876-885, 2010.

- [16] F. Safadi *et al.*, "Bone Structure, Development and Bone Biology: Bone Pathology", pp. 1-50, 2009.
- [17] B. Clarke, "Normal bone anatomy and physiology", (in eng), *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, vol. 3 Suppl 3, no. Suppl 3, pp. S131-S139, 2008.
- [18] J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, and T. Martin, "*Principles of Bone Biology*", 2008.
- [19] D. J. Hadjidakis and I. I. Androulakis, "Bone Remodeling", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1092, no. 1, pp. 385-396, 2006.
- [20] D. Shi and X. Wen, "Bioactive Ceramics: Structure, Synthesis, and Mechanical Properties", pp. 13-28, 2005.
- [21] S. Donglu, "*Introduction to Biomaterials*", 2005.
- [22] T. Leventouri, "Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions", *Biomaterials*, vol. 27, no. 18, pp. 3339-3342, 2006.
- [23] A.-C. M. Florin Miculescu, Andreea Maidaniuc, Cătălina-Andreea Dascălu, Marian Miculescu, Ștefan Ioan Voicu, Robert-Cătălin Ciocoiu, "Biomimetic Calcium Phosphates Derived from Marine and Land Bioresources", *InTech*, 2018.
- [24] S. H. Quan Liu, Jukka Pekka Matinlinna, Zhuofan Chen, and Haobo Pan, "Insight into Biological Apatite: Physiochemical Properties and Preparation Approaches", *Hindawi Publishing Corporation*, no. BioMed Research International, p. 13, 2013.
- [25] M. Mucalo, "Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications", p. 404, 2015.
- [26] D. Raina, "Biomaterials as carriers for bone active molecules-An approach to create off-the-shelf bone substitutes", DOCTORAL DISSERTATION, DEPARTMENT OF CLINICAL SCIENCES LUND, ORTHOPEDICS, Lund University, Lund University, Faculty of Medicine, 2018.
- [27] M. L.-E. Liliana Polo-Corrales, Jaime E. Ramirez-Vick, "Scaffold Design for Bone Regeneration", *J Nanosci Nanotechnol*, 2014.
- [28] Ł. J. Robert Karpiński, Paulina Czubacka, "THE STRUCTURAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF THE BONE", *Journal of Technology and Exploitation in Mechanical Engineering*, vol. 3, no. 1, pp. 43-50, 2017
- [29] A. L. Mescher, M.-H. Education, Ed. *Junqueira'a Basic Histology: Text and Atlas*, 14th ed. 2016.
- [30] A. Syahrom, M. Al-Fatihhi bin Mohd Szali Januddi, M. N. Harun, and A. Öchsner, "Cancellous Bone", in *Cancellous Bone: Mechanical Characterization and Finite Element Simulation*, A. Syahrom, M. Al-Fatihhi bin Mohd Szali Januddi, M. N. Harun, and A. Öchsner, Eds. Singapore: Springer Singapore, pp. 7-20, 2018.
- [31] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone", *Medical Engineering & Physics*, vol. 20, no. 2, pp. 92-102, 1998.
- [32] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, and J. E. Ramirez-Vick, "Scaffold design for bone regeneration", (in eng), *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 15-56, 2014.

- [33] S. Stewart, S. J. Bryant, J. Ahn, and K. D. Hankenson, "Chapter 24 - Bone Regeneration", in *Translational Regenerative Medicine*, A. Atala and J. G. Allickson, Eds. Boston: Academic Press, pp. 313-333, 2015.
- [34] W. Wang and K. W. K. Yeung, "Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review", *Bioactive Materials*, vol. 2, no. 4, pp. 224-247, 2017.
- [35] V. Campana *et al.*, "Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 25, no. 10, pp. 2445-2461, 2014.
- [36] M. Bohner, "Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements", *Injury*, vol. 31, pp. D37-D47, 2000.
- [37] J. Ferguson, M. Diefenbeck, and M. SCNally, "Ceramic Biocomposites as Biodegradable Antibiotic Carriers in the Treatment of Bone Infections", *Journal of bone and joint infection*, vol. 2, no. 1, pp. 38-51, 2017.
- [38] S. Langstaff, M. Sayer, T. J. N. Smith, S. M. Pugh, S. A. M. Hesp, and W. T. Thompson, "Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization", *Biomaterials*, vol. 20, no. 18, pp. 1727-1741, 1999.
- [39] P. V. Giannoudis, H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, "Bone substitutes: an update", (in eng), *Injury*, vol. 36 Suppl 3, pp. S20-7, Nov 2005.
- [40] J. Torres Garcia-Denche, F. Tamimi, M. Alkhraisat, J. Carlos, and E. López-Cabarcos, "*Bone Substitutes*", 2011.
- [41] S. Dorozhkin, "*Current State of Bioceramics*", pp. 353-370, 2018.
- [42] K.-S. Lew, R. Othman, K. Ishikawa, and F.-Y. Yeoh, "Macroporous bioceramics: A remarkable material for bone regeneration", *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 27, no. 3, pp. 345-358, 2011.
- [43] M.-P. Ginebra, M. Espanol, Y. Maazouz, V. Bergez, and D. Pastorino, "Bioceramics and bone healing", (in eng), *EFORT open reviews*, vol. 3, no. 5, pp. 173-183, 2018.
- [44] J. Anita Lett, M. Sundareswari, and K. Ravichandran, "Porous hydroxyapatite scaffolds for orthopedic and dental applications - the role of binders", *Materials Today: Proceedings*, vol. 3, no. 6, pp. 1672-1677, 2016.
- [45] H. X. Peng, Z. Fan, J. R. G. Evans, and J. J. C. Busfield, "Microstructure of ceramic foams", *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 20, no. 7, pp. 807-813, 2000.
- [46] D. Enke, R. Gläser, and U. Tallarek, "Sol-Gel and Porous Glass-Based Silica Monoliths with Hierarchical Pore Structure for Solid-Liquid Catalysis", *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 88, no. 11, pp. 1561-1585, 2016.
- [47] Z. Y. Wu, R. G. Hill, S. Yue, D. Nightingale, P. D. Lee, and J. R. Jones, "Melt-derived bioactive glass scaffolds produced by a gel-cast foaming technique", *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 4, pp. 1807-1816, 2011.
- [48] Z. Wu, Z. Zhou, and Y. Hong, "Gelcasting of through-pore hydroxyapatite ceramics", *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 39, no. 2, pp. 547-553, 2019.
- [49] Q. Fu, E. Saiz, and A. Tomsia, *Bioinspired Strong and Highly Porous Glass Scaffolds*. pp. 1058-1063, 2011.

- [50] L. Montanaro, Y. Jorand, G. Fantozzi, and A. Negro, "Ceramic foams by powder processing", *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 18, no. 9, pp. 1339-1350, 1998.
- [51] S. K. Swain, S. Bhattacharyya, and D. Sarkar, "Preparation of porous scaffold from hydroxyapatite powders", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 31, no. 6, pp. 1240-1244, 2011.
- [52] V. Mawuntu and Y. Yusuf, "Porous-structure engineering of hydroxyapatite-based scaffold synthesized from *Pomacea canaliculata* shell by using polyethylene oxide as polymeric porogen", p. 012045, 2018.
- [53] K. M. Z. Hossain *et al.*, "Porous calcium phosphate glass microspheres for orthobiologic applications", *Acta Biomaterialia*, vol. 72, pp. 396-406, 2018.
- [54] R. J. Farn, *Chemistry and Technology of Surfactants*. Blackwell, 2006.
- [55] P. Linse and M. Malmsten, "Temperature-dependent micellization in aqueous block copolymer solutions". 1992.
- [56] G. Wanka, H. Hoffmann, and W. Ulbricht, "Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions", *Macromolecules*, vol. 27, no. 15, pp. 4145-4159, 1994.
- [57] P. Alexandridis, J. F. Holzwarth, and T. Hatton, "Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association". 1993.
- [58] L. L. Schramm, *Emulsions, Foams and Suspensions: Fundamentals and Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.
- [59] M. S. H. Akash, K. Rehman, and S. Chen, "Pluronic F127-Based Thermosensitive Gels for Delivery of Therapeutic Proteins and Peptides", *Polymer Reviews*, vol. 54, no. 4, pp. 573-597, 2014.
- [60] A. Bureiko, A. Trybala, N. Kovalchuk, and V. Starov, "Current applications of foams formed from mixed surfactant-polymer solutions", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 222, pp. 670-677, 2015.
- [61] K. Malysa and K. Lunkenheimer, "Foams under dynamic conditions", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 13, no. 3, pp. 150-162, 2008.
- [62] A. Saint-Jalmes, "Physical chemistry in foam drainage and coarsening", *Soft Matter*, 10.1039/B606780H vol. 2, no. 10, pp. 836-849, 2006.
- [63] R. v. Klitzing and H.-J. Müller, "Film stability control", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 7, no. 1, pp. 42-49, 2002.
- [64] M. R. PORTER, B. A. PROFESSIONAL, Ed. *Handbook of surfactants*, Second edition ed.
- [65] S. Samanta and P. Ghosh, "Coalescence of bubbles and stability of foams in aqueous solutions of Tween surfactants", *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 89, no. 11, pp. 2344-2355, 2011.
- [66] C. Renó, N. Pereta, C. Bertran, M. Motisuke, and E. Triches, "Study of *in vitro* degradation of brushite cements scaffolds". 2014.

- [67] J. Escobar-Chávez, M. López-Cervantes, A. Naïk, Y. Kalia, D. Quintanar, and A. Ganem, "*Applications of thermo-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations*". pp. 339-58, 2006.
- [68] F. W. A. BEZERRA, "OTIMIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES MICELARES DO PLURONICS® F127 PARA SOLUBILIZAÇÃO E LIBERAÇÃO DE BIOATIVOS", PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2016.
- [69] M. Bohorquez, C. Koch, T. Trygstad, and N. Pandit, "A Study of the Temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 216, no. 1, pp. 34-40, 1999.
- [70] S. Obradović and M. Poša, "The influence of the structure of selected Brij and Tween homologues on the thermodynamic stability of their binary mixed micelles", *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 110, pp. 41-50, 2017.
- [71] M. Helena Amaral, J. Neves, Â. Z. Oliveira, and M. Fernanda Bahia, "*Foamability of Detergent Solutions Prepared with Different Types of Surfactants and Waters*". pp. 275-278. 2008.
- [72] J. Unosson, E. B. Montufar, H. Engqvist, M.-P. Ginebra, and C. Persson, "Brushite foams--the effect of Tween® 80 and Pluronic® F-127 on foam porosity and mechanical properties", (in eng), *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, vol. 104, no. 1, pp. 67-77, 2016.
- [73] C. J. E. Santos, T.-S. Wei, B. Cho, and W. M. Kriven, "A Forming Technique to Produce Spherical Ceramic Beads Using Sodium Alginate as a Precursor Binder Phase", *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 96, no. 11, pp. 3379-3388, 2013.
- [74] J. Zhang *et al.*, "A simple and effective approach to prepare injectable macroporous calcium phosphate cement for bone repair: Syringe-foaming using a viscous hydrophilic polymeric solution", *Acta Biomaterialia*, vol. 31, pp. 326-338, 2016.
- [75] S. Zhang, D. Sun, X. Dong, C. Li, and J. Xu, "Aqueous foams stabilized with particles and nonionic surfactants", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 324, no. 1, pp. 1-8, 2008.