

**UNIVERSIDADE FEDERAL RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CIMENTOS MACROPOROSOS DE
 α -TCP PELO MÉTODO DE ESPUMAÇÃO DIRETA MANUAL**

ANDRÉS FELIPE VÁSQUEZ NIÑO

Dissertação para obtenção de título de mestre em engenharia

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CIMENTOS MACROPOROSOS DE
 α -TCP PELO MÉTODO DE ESPUMAÇÃO DIRETA MANUAL.

ANDRÉS FELIPE VÁSQUEZ NIÑO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Engenharia dos Materiais, modalidade acadêmica.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos

Porto Alegre

2016

*A toda mi familia. Sin ellos no sería quien soy
ni estaría donde estoy.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Prof. Dr. Luis Alberto Loureiro dos Santos pela oportunidade, confiança, orientação e pela disposição em ajudar durante o desenvolvimento deste estudo, bem como ao Labiomat – Laboratório de Biomateriais – da Escola de Engenharia da UFRGS, pelo auxílio e apoio na realização da parte experimental do trabalho.

Aos colegas e amigos do Labiomat pelo apoio, paciência e carinho recebido durante estes dois anos nos que formei parte do grupo.

A Capes e ao governo do Brasil pelo apoio financeiro durante os dois anos do mestrado.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS pela ajuda na preparação das amostras de MEV.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós Graduação, Serviço de Engenharia Biomédica do Hospital de Clinicas pela ajuda na esterilização das amostras.

A toda a equipe da secretaria do PPGE3M pela paciência e ajuda.

A Sara, pela compreensão e carinho. Pelos momentos que vivemos, alguns difíceis e outros excepcionais. Sempre me senti acompanhado embora a distância.

A Santiago, Marco, Caroline, Juan, Cintia, Jorge, Fernando, Elena e Oscar. Sua amizade e apoio incondicional em Porto Alegre foi determinante na conclusão desta etapa.

A toda minha família. Sem seu esforço, luta e sacrifício não estaria hoje tão perto de alcançar esta meta.

RESUMO

Os cimentos de fosfato de cálcio (CFCs) formam uma pasta viscosa após a mistura de uma fase sólida (sal de fosfato de cálcio) com uma fase líquida (água ou uma solução aquosa). Esta pasta endurece, dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfatos de cálcio, que graças à sua formação à temperatura corporal evita uma resposta imunológica negativa do organismo. Embora uma das características mais importantes dos cimentos de α -TCP seja sua reabsorvibilidade pelo organismo, a taxa de reabsorção *In Vivo* pode ser lenta devido à ausência de macroporos abertos. No presente trabalho foram obtidas estruturas macroporosas com presença de interconexões a partir da mistura de cimento de α -TCP com uma fase líquida espumada. A fase líquida foi constituída de diferentes concentrações de hidrogenofosfato de sódio e um surfactante (Lutensol ON 110 ou Lauril Sulfato de Sódio), sendo espumada por agitação manual num sistema composto por 2 seringas conectadas por uma válvula de PVC. Após, foi acrescentado o pó de cimento, o qual foi misturado com a espuma no mesmo sistema. Verificou-se que as soluções com Lutensol apresentaram maior espumabilidade (218 – 400%) que as soluções com Lauril (63 – 209%). A difração de raios X evidenciou a transformação de α -TCP em Hidroxiapatita deficiente em cálcio em todas as amostras após a imersão em solução de Ringer. As amostras preparadas com Lutensol apresentaram macroporos abertos com diâmetros maiores a 100 μ m. Além disso foi observado que a macroestrutura final e o tamanho dos macroporos dos cimentos espumados varia em função das concentrações de fosfato e surfactante, além da proporção L/P. Por outro lado, a resistência a compressão das amostras macroporosas diminuiu com o aumento da porosidade total. Finalmente, foi observada a formação de uma camada contínua de apatita sobre a superfície dos cimentos após imersão em SBF durante 21 dias. Este estudo sugere que as amostras de cimento de fosfato de cálcio espumadas com Lutensol possuem potencial para uso como arcabouços (*scaffolds*) para crescimento de tecidos.

Palavras-chave: Cimento ósseo, Fosfato de cálcio, Surfactante, Macroporosidade

ABSTRACT

Calcium phosphate cements (CPCs) form a viscous paste after mixing a solid phase (a calcium phosphate salt) with a liquid phase (water or an aqueous solution). This paste hardens, forming a precipitate with one or more calcium phosphates, which thanks to their formation at body temperature prevent a negative immune response. Even though one of the most important characteristics of α -TCP cements is their resorbability in the body, their In Vivo resorption rate is low due to the lack of open macropores. In the present work, macroporous interconnected structures were obtained by mixing the α -TCP cement with a foamed liquid phase. The liquid phase was composed of different concentrations of sodium hydrogenphosphate and a surfactant (Lutensol ON 110 or Sodium Lauril Sulfate), and it was foamed by manual agitation in a system of two syringes connected by a PVC valve. The cement powder was then added to the system and mixed with the foam likewise. Solutions with Lutensol showed better foamability (218 - 400%) than solutions with Lauril (63 - 209%). X-ray diffraction showed the transformation of α -TCP into Calcium Deficient Hydroxyapatite in every sample after immersion in Ringer's solution. Samples prepared with Lutensol showed open macropores with diameters greater than 100 μ m. It was found that final macrostructure and size of macropores in the foamed cements vary according to phosphate and surfactant concentrations, as well as to the L/P ratio. It was also found that compressive strength of the macroporous samples decreased with the increase of the total porosity. Finally, a continuous apatite layer was observed on the surface of the cements after immersion in SBF for 21 days. This study suggests that the calcium phosphate cement samples foamed with Lutensol have potential to be applied as scaffolds for bone tissue regeneration.

Keywords: Bone cement, Calcium phosphate, surfactant, macroporosity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1. Fosfatos de Cálcio	19
3.1.1. α -TCP.....	20
3.1.2. Aplicações dos Fosfatos de Cálcio.....	22
3.2. Cimentos de Fosfato de Cálcio.....	23
3.2.1. Tempo de pega e coesão	25
3.2.2. Propriedades Mecânicas e Porosidade	28
3.2.3. Reabsorbilidade.....	31
3.2.4. Cimentos de Brushita	32
3.2.5. Cimentos apatíticos	35
3.2.6. Cimentos de α -TCP	36
3.3. Espumas.....	37
3.3.1. Surfactantes	39
3.4. Engenharia de tecidos.....	42
3.4.1. Engenharia de tecido ósseo	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1. Materiais utilizados	53
4.2. Síntese do α -TCP	53

4.2.1.	Caracterização do α -TCP.....	55
4.3.	Avaliação das soluções e planejamento do experimento	56
4.3.1.	Espumabilidade da solução.....	59
4.3.2.	Estabilidade da Espuma	60
4.4.	Preparação dos cimentos macroporosos de α -TCP.....	60
4.5.	Caracterização estrutural e mecânica dos cimentos	61
4.5.1.	Difração de Raios X.....	61
4.5.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura	61
4.5.3.	Porosidade.....	62
4.5.4.	Resistência à Compressão.....	63
4.6.	Caracterização <i>In Vitro</i>	64
4.6.1.	Preparação do Fluido Corporeo Simulado (SBF)	64
4.6.2.	Imersão das amostras em SBF	64
5.	ANÁLISE DE RESULTADOS	66
5.1.	Caracterização do α -TCP.....	66
5.1.1.	Difração de Raios X.....	66
5.1.2.	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	67
5.1.3.	Granulometria a Laser e Microscopia Eletrônica de Varredura.....	68
5.2.	Avaliação das soluções.....	70
5.2.1.	Espumabilidade.....	70
5.2.2.	Estabilidade.....	73
5.3.	Preparação dos corpos de prova	74
5.4.	Caracterização das amostras.....	76
5.4.1.	Difração de Raios X.....	76

5.4.2.	Porosidade e Microscopia Eletrônica de Varredura.....	78
5.4.3.	Resistência à Compressão.....	98
5.5.	Caracterização <i>In Vitro</i>	102
5.5.1.	Imersão em SBF.....	102
6.	CONCLUSÕES	106
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	108
8.	REFERÊNCIAS.....	109

LISTA DE ABREVIACES

α -TCP – Fase alfa do fosfato tricálcico

β -TCP - Fase beta do fosfato tricálcico

ρ_{ap} – Densidade Aparente

σ_0 – Resistência  compressão com 0% de porosidade

σ – Resistência  compressão

μm – micrmetro

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

BPM – Batidas por minuto

CaP – Fosfato de Cálcio

Ca/P – Razão molar cálcio/fósforo

CDHA – Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio

CFC – Cimento de Fosfato de Cálcio

CMC – Concentrao Micelar Crítica

CT – Tempo de coesão

DCPD – Fosfato de Cálcio Dihidratado

d_m – Tamanho médio de partícula

DRX – Difroo de Raios X

F – Tempo final de pega

FTIR – Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier

g – gramas

GPa – Giga Pascal

HA – Hidroxiapatita

I – Tempo inicial de pega

L110 – Lutensol ON 110

L/P – Proporção líquido/pó

MCPM - Fosfato Monocálcico Mono-Hidratado

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

min - Minutos

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MPa – Mega Pascal

p – Valor-p

PMMA – Polimetil Metacrilato

R^2 – Coeficiente de determinação ajustado

RPM – Revoluções por minuto

SBF – Fluido Corporal Simulado (Simulated Body Fluid)

SLS – Lauril Sulfato de Sódio

T - Temperatura

TE – Engenharia de Tecidos

TTCP – Fosfato Tetracálcico

wt% – Percentual em peso

LISTA DE FIGURAS

Fig. 3.1. Algumas formas de apresentação dos fosfatos de cálcio. (a) Implantes ósseos; (b) Scaffolds; (c) cimentos macroporosos. (Dorozhkin, 2007, 2010; Ginebra et al., 2007)....	23
Fig. 3.2. Evolução com o tempo da microestrutura de um cimento de α -TCP imerso em solução de Ringer por (a) 2h, (b) 8h, (c) 64 e (d) 360h. (Ginebra, Driessens, e Planell, 2004)	24
Fig. 3.3. Descrição gráfica dos tempos de pega e a sua relação com os tempos de intervenção cirúrgica. Adaptado de (Dorozhkin, 2008)	26
Fig. 3.4. Cimentos de CaP comerciais. (Dorozhkin, 2013).....	27
Fig. 3.5. Teste de coesão para diferentes CFC. (a) Controle; (b), (c) e (d) CFC com aditivos para melhoramento da coesão (Xu et al., 2004).....	28
Fig. 3.6. Resistência à Compressão em função da porosidade. Adaptado de (Zhang et al., 2014)	29
Fig. 3.7. Porosimetria de Inclusão de Mercúrio (MIP) de (a) CFC e (b) Espuma de CFC. Adaptado de (E. B. Montufar et al., 2010).....	30
Fig. 3.8. Influência do tamanho de partícula e a razão L/P na porosidade intrínseca do CFC. Adaptado de (Ginebra et al., 2012).....	31
Fig. 3.9. Isotermas de solubilidade ($\log[\text{Ca}]$ vs pH) para os diferentes ortofosfatos de cálcio. Adaptado de (M. Bohner, 2001)	34
Fig. 3.10. Características dos CFC. Adaptado de (Ginebra et al., 2012).....	36
Fig. 3.11. (a) Processo de drenagem da espuma. (b) Filmes finos de líquido e borde de plateau. Adaptado de (Lyon, 2002).....	38
Fig. 3.12. Processo de maturação de Ostwald. (Salager, Andérez, e Forgiarini, 2003).....	39
Fig. 3.13. Influência da concentração do surfactante na tensão superficial e na formação micelar (Scientific, 2014).....	40
Fig. 3.14. Macroporosidade de cimentos de fosfato de cálcio obtida por diferentes métodos. (a) Réplica de uma espuma de poliuretano. (b) Sacrifício de manitol como agente porogênico. (c) Impressão 3D.	46

Fig. 3.15. Cimento de fosfato de cálcio espumado com (a) Albúmen, (b) Tween 80, (c) Lauril Sulfato de Sódio e (d) Lutensol ON 110.....	50
Fig. 3.16. Representação esquemática da preparação de uma espuma de cimento de fosfato de cálcio. (E. B. Montufar et al., 2010).....	51
Fig. 4.1. Metodologia proposta para desenvolvimento do trabalho de pesquisa.	52
Fig. 4.2. Sistema de mistura utilizado na precipitação do pó de CaP. Composto por manta elétrica, balão de fundo redondo de 3 bocas, termopar, agitador elétrico e funil de decantação.	54
Fig. 4.3. Distribuição experimental do desenho proposto.....	57
Fig. 4.4. Dispositivo de mistura do sistema Cimento/Líquido. (a) Espumação da solução. (b) Obtenção da pasta cimentícia.....	59
Fig. 5.1. Difractogramas de raios X dos fosfatos de cálcio obtidos por via úmida. (a) Antes e (b) depois da calcinação a 1400°C por uma hora.....	66
Fig. 5.2. Espectro FTIR do α -TCP sintetizado por via úmida.	68
Fig. 5.3. Análise granulométrico do α -TCP após moagem e peneiramento a través da malha #325.....	69
Fig. 5.4. Microscopia MEV do pó de α -TCP moído e peneirado. (a) 600x e (b) 1000x.....	70
Fig. 5.5. Superfícies de resposta para a espumabilidade das soluções com (a) SLS e (b) L110.	71
Fig. 5.6. Superfície de resposta para a estabilidade das soluções com Na_2HPO_4 e L110. ...	73
Fig. 5.7. Moldes para a elaboração das amostras. (a) 8x2,7mm e (b) 6x12mm.....	75
Fig. 5.8. Problemas observados na elaboração das amostras de cimento pelo método proposto. (a) Cimento não injetado após a segregação do líquido. (b) Cristais precipitados na solução L3 depois de 1 mês de ser preparada.	75
Fig. 5.9. Difração de raios X das amostras de cimento (a) L1, (b) L3, (c) L5, (d) L8 e (e) L10	77

Fig. 5.10. Micrografias MEV para a amostra C-0,73 a (a) Seção transversal, (b) Superfície a maiores aumentos, e para a amostra 73-L9 (c) microestrutura.	80
Fig. 5.11. Micrografias MEV para as amostras de cimento elaboradas com L/P=0,73mL/g. (a) 73-L3, (b) 73-L5, (c) 73-L6, (d) 73-L7, (e) 73-L8, (f) 73-L9.	82
Fig. 5.12. Distribuição de tamanho de poros para as amostras de cimento espumadas com as soluções L3, L5, L6, L7, L8 e L9 com L/P=0,73mL/g.	85
Fig. 5.13. Porosidade total dos cimentos elaborados com 0,73 e 0,60mL/g.	89
Fig. 5.14. Macroporosidade total dos cimentos elaborados com 0,73 e 0,60mL/g.	90
Fig. 5.15. Micrografias MEV para as amostras de cimento elaboradas com L/P=0,60mL/g. (a) 60-L3, (b) 60-L5, (c) 60-L6, (d) 60-L7, (e) 60-L8, (f) 60-L9.	92
Fig. 5.16. Macroporo interconectado correspondente à amostra 60-L8.	94
Fig. 5.17. Distribuição de tamanho de poros para as amostras de cimento espumadas com as soluções L3, L5, L6, L7, L8 e L9 com L/P=0,60mL/g.	96
Fig. 5.18. Resistência à compressão em função da porosidade total das amostras de cimento elaboradas com L/P=0,73mL/g.	98
Fig. 5.19. Resistência à compressão em função da porosidade total das amostras de cimento elaboradas com L/P=0,60mL/g.	99
Fig. 5.20. Resistências à compressão das espumas de cimento de α -TCP elaboradas com diferentes L/P.	100
Fig. 5.30. Variação da massa da amostra 60-L9 após imersão em SBF por vários períodos de tempo.	103
Fig. 5.31. Micrografias MEV da amostra 60-L9 imersa em SBF por: 1 dia (a) e (b) e 21 dias (c) e (d).	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Relação Ca/P dos ortofosfatos de cálcio e suas constantes de solubilidade. (Dorozhkin, 2007; Fernández et al., 1999).	19
Tabela 3.2. Propriedades físicas e químicas dos surfactantes Lauril Sulfato de Sódio e Lutensol ON 110.	41
Tabela 3.3. Porosidade total, macroporosidade e resistência à compressão de cimentos de fosfato de cálcio macroporosos fabricados por espumação direta.	48
Tabela 4.1. Parâmetros do processo da precipitação via úmida.	55
Tabela 4.2. Concentrações das variáveis independentes SLS, L110 e Na ₂ HPO ₄	57
Tabela 4.3. Quadro de ensaios do planejamento composto central.	58
Tabela 4.4. Concentração iônica do SBF e do Plasma Sanguíneo.	64
Tabela 5.1. Composições das soluções selecionadas para elaborar as amostras de cimento.	74
Tabela 5.2. Densidade aparente, Porosidade total e Macroporosidade das amostras de cimento espumado fabricadas com uma razão L/P=0,73mL/g. Os valores estão acompanhados do desvio padrão entre parêntesis.	78
Tabela 5.3. Tamanho médio de poro das amostras de cimento espumadas com L/P=0,73mL/g.	86
Tabela 5.4. Densidade aparente, Porosidade total e Macroporosidade das amostras de cimento espumado fabricadas com uma razão L/P=0,60mL/g. Os valores estão acompanhados do desvio padrão entre parêntesis.	88
Tabela 5.5. Tamanho médio de poro das amostras de cimento espumadas com L/P=0,60mL/g.	97
Tabela 5.8. Variação da massa das amostras de cimento de α -TCP após imersão em SBF por diferentes períodos de tempo.	102

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa e desenvolvimento de materiais sintéticos que favoreçam a regeneração do tecido ósseo quando implantados no corpo tem sido uma das prioridades da engenharia de tecidos (TE). A engenharia de tecidos surgiu como um campo interdisciplinar que associa os princípios da engenharia com as ciências naturais com o objetivo de desenvolver substitutos para restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos fisiológicos (Langer e Vacanti, 1993). Uma das áreas da ET é a fabricação de arcabouços ou *scaffolds* desenhados para aplicações regenerativas, os quais podem ser elaborados a partir de uma grande variedade de biomateriais poliméricos, metálicos, cerâmicos e compósitos. Da mesma forma, os *scaffolds*, dependendo da sua aplicação, devem cumprir certos requisitos correspondentes às suas propriedades físicas, químicas, mecânicas e estruturais. Assim, os *scaffolds* tridimensionais aplicados à regeneração óssea devem apresentar principalmente afinidade com o tecido ósseo, uma elevada porosidade (>70%) e macroporos interconectados com diâmetros maiores a 150µm. Isto é de muita importância, já que desta forma é facilitado o transporte de nutrientes através do material, permitindo a vascularização durante o tempo de implante, o que favorece a adesão e proliferação celular dentro do implante. (Coelho e Pereira, 2005; Karande *et al.*, 2004)

O osso pode ser descrito como um material compósito, formado por uma fase orgânica e uma mineral, conhecida como apatita carbonatada. Devido à similaridade química com o componente mineral do osso, os ortofosfatos de cálcio tem sido amplamente estudados como materiais adequados para preenchimento e regeneração do tecido ósseo. Dentre estes cerâmicos, os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) exibem características chamativas para tais aplicações, como por exemplo moldabilidade, injetabilidade, preenchimento de cavidades mínimas, bioatividade, reabsorvibilidade e endurecimento *In Situ* à temperatura ambiente (del Real *et al.*, 2003; dos Santos *et al.*, 2002). Basicamente, uma pasta viscosa é formada após a mistura de uma fase sólida (pó cimentício) com uma fase líquida (solução aquosa). A pasta endurece, obtendo como produto final da reação de pega, no caso dos cimentos apatíticos, hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), que graças à sua formação à temperatura

corporal, apresenta maior similaridade química e cristalográfica com as apatitas biológicas e uma maior superfície específica do que a hidroxiapatita sinterizada (Almirall *et al.*, 2004).

Ainda que os cimentos apatíticos de fosfato de cálcio são materiais microporosos e solúveis no organismo, a taxa de reabsorção destes compostos é muito lenta. Isto é explicado pela ausência de porosidade aberta com diâmetros maiores a 150 μ m no volume do material (Burg, Porter e Kellam, 2000). Assim, uma estrutura macroporosa interconectada é necessária para garantir uma maior taxa de reabsorção do material, além de guiar a formação de novo osso através da estrutura do cimento (osteocondução). A proliferação celular é ajudada pela formação de vasos sanguíneos através da estrutura do cimento, os quais permitem fornecer nutrientes e oxigênio, além de permitir o transporte de proteínas (Shepherd e Best, 2011).

Diferentes metodologias para induzir macroporosidade nos cimentos de fosfato de cálcio foram reportadas na literatura. Estes procedimentos são geralmente os mesmos utilizados para obter cerâmicas celulares. Dentre estas técnicas se encontram principalmente métodos de réplica, sacrifício de agentes porogênicos, prototipagem rápida e espumação direta. Entre as vantagens da espumação direta encontram-se a simplicidade do processo e a indução da macroporosidade antes do endurecimento, o que permite a injetabilidade da pasta espumada.

Este trabalho teve como objetivo a avaliação estrutural e mecânica de cimentos de fosfato de cálcio macroporosos obtidos por uma nova metodologia de preparação. No estudo foram utilizados dois tipos de surfactantes –Lauril Sulfato de Sódio e Lutensol ON 110– e hidrogeno fosfato de sódio dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), utilizando diferentes concentrações na fase líquida do cimento para estudar o comportamento da espuma formada a partir dessas soluções e avaliar a influência destas variáveis na macroestrutura final dos cimentos de α -TCP preparados por esta metodologia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obtenção e avaliação de um cimento macroporoso de α -TCP a partir da espumação da fase líquida do cimento em um sistema de mistura manual e simples.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter pó de α -TCP de elevada pureza a partir da metodologia via úmida.
- Testar diferentes concentrações de hidrogenofosfato de sódio dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) e um surfactante na fase líquida do cimento.
- Avaliar a influência das concentrações de Na_2HPO_4 e dos surfactantes na macroestrutura final das amostras do cimento.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio (CaP) são um conjunto de materiais cerâmicos de especial importância na área de biomateriais devido à sua similaridade química com o constituinte mineral dos ossos e dentes (León e Jansen, 2009). Devido a isto, a maioria dos fosfatos de cálcio apresentam alta biocompatibilidade e bioatividade no organismo, razão pela qual estes materiais são amplamente utilizados para fabricação de enxertos artificiais (Dorozhkin, 2007). Por definição todos os CaP estão constituídos principalmente de Cálcio (+2), fósforo (+5) e oxigênio (-2). Além disto, a sua composição química pode incluir hidrogênio, tanto como um ânion ortofosfato ácido (HPO_4^{2-} ou H_2PO_4^-), quanto como água incorporada ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Elliot, 1994). Os ortofosfatos de cálcio biologicamente relevantes são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Relação Ca/P dos ortofosfatos de cálcio e suas constantes de solubilidade. (Dorozhkin, 2007; Fernández *et al.*, 1999).

Relação Ca/P	Composto	Fórmula Química	$-\log(K_{sp})$ a 25°C	$-\log(K_{sp})$ a 37°C
0,5	Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,14	-
0,5	Fosfato monocálcico anidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1,14	-
1	Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,59	6,63
1	Fosfato dicálcico (DCP)	CaHPO_4	6,90	7,02
1,33	Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,6	95,9
1,5	α -Fosfato tricálcico (α-TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,5	25,5
1,5	β -Fosfato tricálcico (β-TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	29,5
1,5-1,6	Hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	~85,1	~85,1
1,67	Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	117,2
2	Fosfato Tetracálcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38-44	42,4

A proporção Ca/P, o caráter ácido ou básico e a solubilidade são as características mais importantes dos CaPs. Quanto menor o valor da relação Ca/P, menor o pH e maior a solubilidade do fosfato de cálcio em soluções aquosas. Mesmo assim, a maioria dos fosfatos de cálcio apresentam uma solubilidade moderada em água, mas são solúveis em meios

ácidos. Adicionalmente, são insolúveis em soluções alcalinas (Dorozhkin, 2007; Elliot, 1994).

Além de apresentar biocompatibilidade, alguns dos fosfatos de cálcio se classificam como materiais bioativos e reabsorvíveis. Por um lado, a natureza bioativa do material favorece a formação de uma camada fina superficial de apatita biológica, a qual atua como interface entre o material enxerto e o osso, ligando quimicamente a superfície do implante ao tecido ósseo, isto é conhecido como osteointegração. Por outro lado, um material reabsorvível se caracteriza por se dissolver no organismo e permitir a formação de novo tecido ósseo que favorece a adesão e proliferação de osteoblastos através de um molde ou padrão. (Dorozhkin, 2007, 2010; Hench, 1991). A Hidroxiapatita (HA) é um exemplo de um material bioativo, no entanto, os fosfatos tricalcicos (α - e β -TCP) e a Hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) são materiais reabsorvíveis.

3.1.1. α -TCP

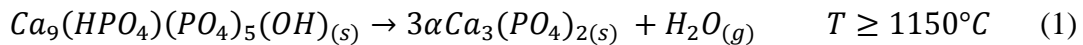
O α -TCP é polimorfos do sal de Fosfato Tricalcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], tem uma estrutura cristalina monoclinica, uma relação Ca/P de 1,5 e é estável a temperaturas na faixa de 1125°-1430°C. A densidade teórica deste composto é 2,863g/cm³. É uma fase com um importante grau de solubilidade e estável a altas temperaturas; além disto é impossível obtê-la diretamente a partir de métodos de síntese úmidos (Elliot, 1994).

3.1.1.1. *Síntese do α -TCP*

Uma vez que o α -TCP é um fosfato de cálcio metastável a temperatura ambiente, isto é, é uma fase estável somente em uma faixa de temperaturas entre 1120 e 1470°C (Safronova *et al.*, 2011), é impossível sintetizá-lo por precipitação entre soluções aquosas. Por consequência, este fosfato de cálcio pode ser obtido por reações em estado sólido em altas temperaturas a partir de composto(s) precursor(es) que contenham íons Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$ e uma relação Ca/P aproximadamente igual a 1,5 (Safronova *et al.*, 2011). Desse modo, as duas metodologias mais empregadas para a síntese de α -TCP são a transformação térmica da

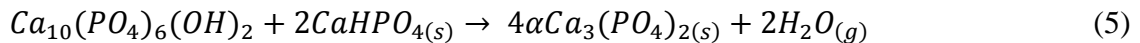
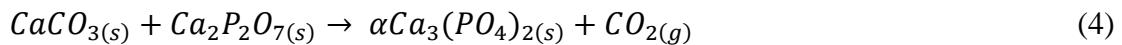
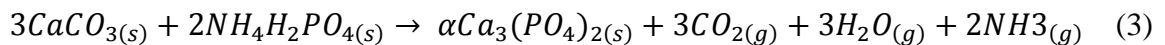
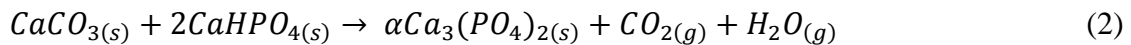
Hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA, Ca/P≈1,5) e a reação de estado sólido de compostos precursores.

Por um lado, a CDHA é um fosfato de cálcio não estequiométrico (Ca/P=1,5 – 1,6) em relação à Hidroxiapatita (Ca/P=1,67), o qual pode ser sintetizado a temperatura ambiente por via úmida, ou seja, através da precipitação do sal por interações de soluções contendo íons de cálcio e fósforo. Assim, o CDHA apresenta baixa cristalinidade e substituições iônicas em sua rede. Além disso é o composto precursor do α -TCP por decomposição térmica conforme a reação:



Na reação 1 é possível observar que a relação Ca/P da CDHA nesse caso é igual a 1,5. Não acontecerá a transformação em α -TCP se essa relação diferir relevantemente desse valor.

Por outro lado, a reação de estado sólido entre precursores é a mais reportada na literatura. As reações mais empregadas são descritas a seguir (Carrodegua e De Aza, 2011):



O procedimento consiste geralmente em uma moagem úmida simultânea dos precursores com o intuito de reduzir o tamanho de partícula, incrementar a área de contato e conseguir uma mistura homogênea dos compostos. Após a homogeneização dos precursores, estes são tratados termicamente acima da temperatura de transformação, a qual varia entre 1250 e 1500°C, seguida comumente da têmpera em ar do material para evitar a reversão da fase de α -TCP.

3.1.2. Aplicações dos Fosfatos de Cálcio

Segundo Cranin (Cranin, 1985) para que um material seja aceito como material de implante, deve cumprir estes requisitos fundamentais:

- Biocompatibilidade: O material não deve gerar ou causar respostas nocivas nos tecidos vivos do local de implante.
- Estabilidade: Os tecidos não devem causar a degradação indesejada do material, por exemplo corrosão.
- Biofuncionalidade: O material deve apresentar propriedades mecânicas adequadas para poder desempenhar a função desejada durante o tempo desejado.
- Esterilizável: O material deve permitir a sua esterilização, sem danificar sua integridade física e mecânica.

Os fosfatos de cálcio cumprem com todas essas condições. No entanto, seu elevado módulo de elasticidade (HA: 40-117 GPa) (Park e Lakes, 2007) e as baixas propriedades mecânicas (elevada fragilidade e deficiente resistência à fadiga) impedem a sua aplicação em enxertos ortopédicos que necessitem de elevadas resistências às cargas cíclicas. No entanto, os CaPs são amplamente utilizados em aplicações biomédicas. A Figura 3.1 apresenta algumas das formas de apresentação dos fosfatos de cálcio: preenchimento ósseo, cimentos injetáveis, *scaffolds*, recobrimentos de metais e ligas com filmes finos, implantes dentários, material para aumento ósseo, entre outros.

Do mesmo modo, Dorozhkin (Dorozhkin, 2007) destaca os requisitos aos quais um material ideal para enxertos ósseos deve atender, que são: porosidade igual ou maior a 150 μ m, uma taxa de reabsorção comparável com a formação de novo tecido ósseo e estabilidade mecânica suficiente. Assim, graças à versatilidade dos fosfatos de cálcio, diferentes tipos de processamento podem ser utilizados a fim de se obter diversas combinações de morfologias, propriedades e composições químicas, dependendo do tipo de aplicação.

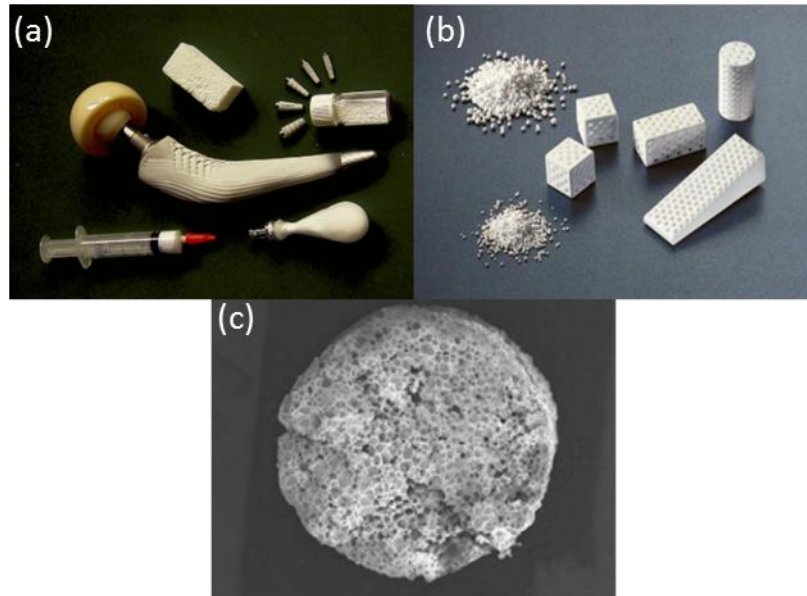


Fig. 3.1. Algumas formas de apresentação dos fosfatos de cálcio. (a) Implantes ósseos; (b) *Scaffolds*; (c) cimentos macroporosos. (Dorozhkin, 2007, 2010; Ginebra *et al.*, 2007)

Os implantes e enxertos ósseos representaram somente nos Estados Unidos um valor de ~US\$1,3 bilhões no mercado no ano 2010. Além disso, tem uma previsão de ~US\$2,3 para o ano 2017 (Prweb, 2011). Por esta razão os fosfatos de cálcio são e serão materiais de grande importância no mercado biomédico.

3.2. Cimentos de Fosfato de Cálcio

Os Cimentos de Fosfato de Cálcio (CFC) foram desenvolvidos por Brown e Chow na década de 1980 (Brown e Chow, 1985). Estes cimentos são constituídos principalmente por um pó ou pós de ortofosfatos de cálcio e uma fase líquida. Apesar de haver vários tipos de formulações, os produtos finais dos cimentos de fosfato de cálcio são majoritariamente dois: Brushita (DCPD) ou Hidroxiapatita deficiente em Cálcio (CDHA), conhecidos como cimentos apatíticos. Por um lado, o CFC de Brushita consiste de numa mistura seca de dois ortofosfatos de cálcio diferentes, sendo um desses de caráter ácido e o outro básico, a fim de gerar um endurecimento da pasta cimentícia a partir de reações ácido-base; ou numa formulação com um fosfato de cálcio básico e um ácido (H_3PO_4). Por outro lado, o CFC apatítico, dá pega por reações ácido-base ou, a diferença do CFC de Brushita, apresenta uma

reação de endurecimento onde o produto final é formado por um processo de hidrólise do pó cimentante. Aliás, em algumas formulações (cimentos de α -TCP), a CDHA pode exibir a mesma relação Ca/P do pó cimentante. (M. Bohner, 2000; Dorozhkin, 2007)

Basicamente, os cimentos de fosfato de cálcio endurecem por processos de dissolução do pó cimentante e posterior precipitação de um fosfato de cálcio de menor solubilidade (CDHA ou DCPD). Durante a dissolução, as partículas do pó inicial liberam íons de cálcio e fósforo à solução, aumentando a concentração até atingir um estado de supersaturação destes íons. Quando alcançar a concentração crítica ocorrerá a precipitação ou nucleação da nova fase de CaP ao redor das partículas de pó. Estes precipitados formam uma rede emaranhada de cristais com uma morfologia de agulhas, a qual confere a resistência mecânica do cimento (Fig. 3.2). O processo de nucleação e crescimento da nova fase continua conforme a dissolução do pó cimentício.

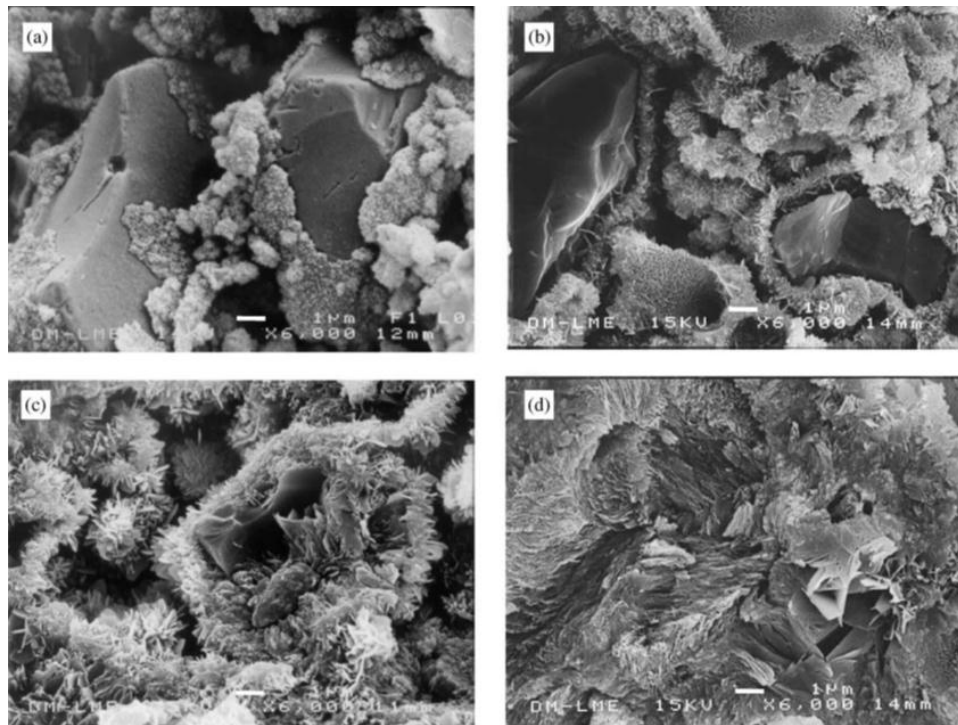


Fig. 3.2. Evolução com o tempo da microestrutura de um cimento de α -TCP imerso em solução de Ringer por (a) 2h, (b) 8h, (c) 64 e (d) 360h. (Ginebra, Driessens, e Planell, 2004)

Em contraste com os cimentos de PMMA, os cimentos de ortofosfatos de cálcio não endurecem por reações de polimerização, por conseguinte não liberam elevadas quantidades de calor. Os CFCs também não apresentam problemas por liberação de monômeros sem reagir na corrente sanguínea. Outrossim, os produtos da reação cimentante (CDHA e DCPD) apresentam biocompatibilidade com o organismo, devido à sua similaridade química com o componente mineral do osso, além de favorecer a regeneração óssea por processos de reabsorção e nucleação de novo tecido ósseo.

3.2.1. Tempo de pega e coesão

O tempo de endurecimento e a coesão dos cimentos de fosfato de cálcio tem sido amplamente estudados com a finalidade de melhorar as formulações para uma aplicação *In Vivo*. Geralmente os tempos de pega de um cimento estão na faixa de minutos ou horas, em outras palavras, não cumprem com os tempos ideais para uma intervenção cirúrgica (Fig. 3.3), já que uma reação de pega retardada do cimento implantado pode ocasionar respostas inflamatórias severas pela desintegração da pasta. Da mesma forma, uma pasta de cimento com baixa coesão pode causar reações adversas no local ou vizinhança do implante.

A taxa de endurecimento, ou seja a taxa dos processos de dissolução e precipitação do pó cimentante, depende de vários parâmetros, dentre os quais sobressaem:

- O tamanho de partícula do pó cimentante
- A relação líquido/pó (mL/g) da mistura
- A composição química da fase líquida

Clinicamente os tempos relacionados com a pega dos cimentos são de grande importância para a sua aplicação. O tempo inicial de pega (I) descreve o tempo a partir do qual a pasta de cimento não pode ser deformada sem danificar a sua estrutura. Além disso, o tempo final de pega (F) indica o tempo a partir do qual a pasta de cimento pode ser manipulada sem riscá-la. (Khairoun *et al.*, 1998). Os tempos (I) e (F) foram definidos em minutos, segundo a experiência dos pesquisadores com cirurgias da seguinte maneira:

$$3 \leq I < 8 \quad (6)$$

$$I - CT \geq 1 \quad (7)$$

$$F \leq 15 \quad (8)$$

CT significa tempo de coesão e descreve o tempo depois do qual a pasta de cimento não se desintegra ao ser imersa em solução de Ringer. Por tudo isto o cimento de fosfato de cálcio deveria ser aplicado depois do CT e antes do tempo I. A expressão (7) indica que entre o CT e o tempo I deve haver uma diferença mínima de um minuto, isto é para garantir que o cirurgião possua tempo suficiente para aplicar a pasta na ferida depois de misturá-la, evitando o endurecimento inicial do cimento (Khairoun *et al.*, 1998).

A Figura 3.3 apresenta uma descrição gráfica dos tempos de pega, onde estabelece os tempos de implante do CFC no corpo. Ele não pode ser implantado antes de atingir o CT, de tal forma que deveria ser aplicado durante o intervalo entre CT e I, sendo 8 minutos o tempo máximo em que o cimento dê a pega inicial. Além disso, a ferida deve ser fechada depois de atingir F, sendo clinicamente inaceitáveis tempos maiores a 15 minutos.

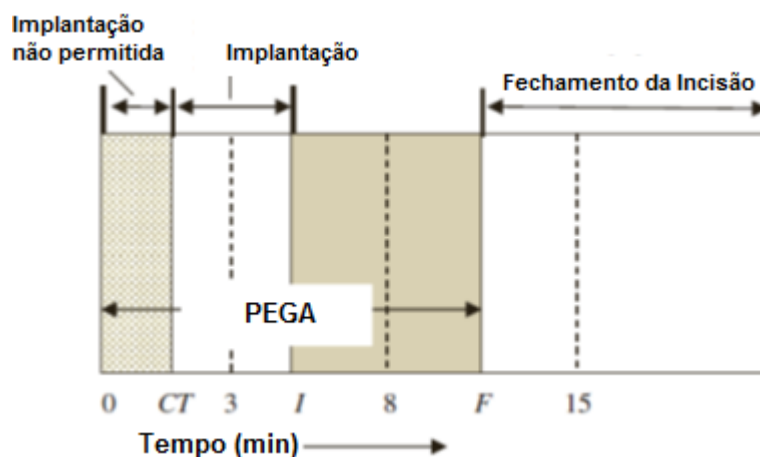


Fig. 3.3. Descrição gráfica dos tempos de pega e a sua relação com os tempos de intervenção cirúrgica.

Adaptado de (Dorozhkin, 2008)

Como foi expresso anteriormente, os tempos de pega de um cimento podem estar na faixa de horas, impossibilitando sua implantação *In Vivo*. Com o propósito de favorecer a cinética da reação é possível:

- Diminuir o tamanho médio de partícula (aumentar a área superficial específica).
- Diminuir a cristalinidade do pó cimentício.
- Utilizar aceleradores de reação, por exemplo Na_2HPO_4 .
- Diminuir a razão líquido/pó (mL/g) da mistura.

No entanto, tempos de pega abaixo dos apresentados na Figura 3.3 diminuiriam a trabalhabilidade do cimento antes do cirurgião poder implantar a pasta na ferida. Assim, é de grande importância ajustar os tempos de pega aos expressos anteriormente.

Contudo, os cimentos de fosfato de cálcio são versáteis na hora de implantar a pasta no local da ferida, já que podem ser facilmente moldados e adaptados no local de implante. O cimento pode ser aplicado pelo cirurgião com os dedos, com espátula ou injetado (Fig. 3.4). Desse modo, dependendo da forma de aplicação, a pasta de cimento de CaP deve exibir certas características ou propriedades. Por um lado, a pasta para implantar com espátula precisa uma formulação que confira a ela uma alta viscosidade (Dorozhkin, 2008). Isto pode ser atingido diminuindo a relação líquido/pó da formulação. Pelo contrário, um cimento injetável requer de uma pasta de baixa viscosidade (elevada relação líquido/pó) para poder ser estruído através da seringa e/ou da agulha. No entanto, a viscosidade deve ser suficiente para evitar a separação das fases da pasta de cimento. Este fenômeno é conhecido como Filter – Pressing e resulta na injeção do líquido sem a fase sólida da mistura (M. Bohner, 2000).



Fig. 3.4. Cimentos de CaP comerciais. (Dorozhkin, 2013)

A maioria dos cimentos, ao serem implantados na forma de pasta para dar pega *In Situ*, podem sofrer desintegração ao entrar em contato com sangue ou outros fluidos (Fig. 3.5). A Coesão é definida como a capacidade de um cimento dar pega num ambiente aquoso sem se desintegrar (Khairoun, Driessens *et al.*, 1999). Este fenômeno pode ser compreendido

como a interação das forças que atuam tanto entre as partículas do cimento na pasta, quanto entre a pasta e o fluido circundante (Bohner *et al.*, 2006). Portanto, a coesão dos cimentos de fosfato de cálcio pode ser melhorada incrementando as forças de atração entre as partículas da pasta cimentícia ou diminuindo a pressão osmótica do sistema.

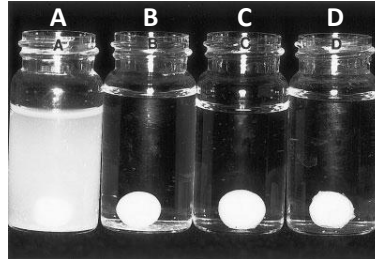


Fig. 3.5. Teste de coesão para diferentes CFC. (a) Controle; (b), (c) e (d) CFC com aditivos para melhoramento da coesão (Xu *et al.*, 2004).

Similarmente aos métodos de diminuição do tempo de pega, a coesão do cimento pode ser melhorada utilizando um pó de cimento com um menor tamanho médio de partícula ou diminuindo a razão líquido/pó da pasta. Além disso, aumentar a viscosidade da fase líquida é outro método de aumentar a coesão da pasta. Para isto podem ser empregados diferentes biopolímeros em teores relativamente baixos, tais como: Alginato de Sódio, Ácido Hialurônico, Quitosana, entre outros.

3.2.2. Propriedades Mecânicas e Porosidade

Devido aos diferentes tipos de metodologias utilizados na fabricação de cimentos de fosfato de cálcio, as propriedades mecânicas destes materiais apresentam uma ampla faixa de valores. Em outras palavras, a microestrutura do cimento é determinante na hora de avaliar as propriedades mecânicas dos cimentos. Em contraste com as biocerâmicas tradicionais, os cimentos de fosfato de cálcio não precisam de tratamentos de sinterização para seu conformado. As propriedades mecânicas dos cimentos são resultado da precipitação de cristais de CaP com morfologia acicular, formando uma rede emaranhada, a qual confere a rigidez mecânica ao cimento. A variação dos parâmetros do processo, por exemplo composição química do cimento, razão L/P, tamanho de partícula, aditivos no líquido ou pó, condições de envelhecimento, entre outros, influem nas propriedades finais do cimento.

Por serem materiais cerâmicos, os CFC são compostos frágeis com uma baixa resistência mecânica sob esforços de tensão. Além disso, estes materiais são sensíveis à porosidade. Os parâmetros mencionados anteriormente influenciam as propriedades mecânicas dos CFC já que estes parâmetros afetam diretamente o grau de porosidade do material.

A Figura 3.6 apresenta uma compilação de resistências mecânicas à compressão de diferentes estudos em função do grau de porosidade das amostras.

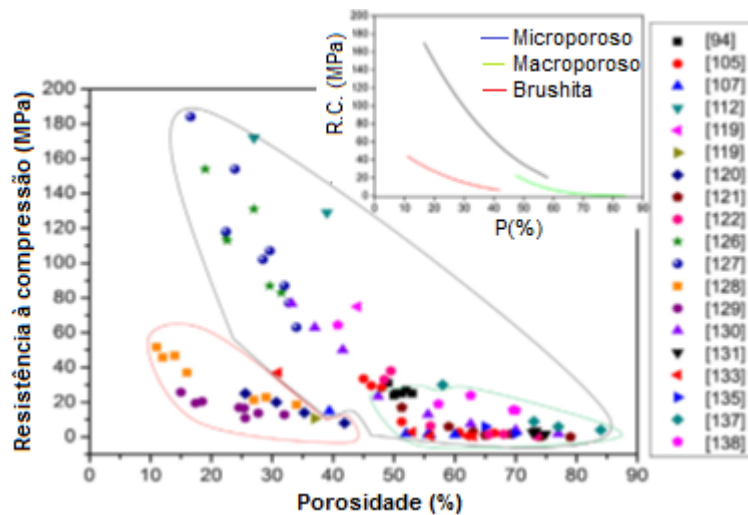


Fig. 3.6. Resistência à Compressão em função da porosidade. Adaptado de (Zhang *et al.*, 2014)

De acordo com a figura, ao aumentar a porcentagem de porosidade dos cimentos diminui a sua resistência de forma exponencial. A linha vermelha exhibe o comportamento mecânico de cimentos de Brushita, da mesma forma, as linhas preta e verde descrevem a dependência da resistência de cimentos apatíticos com microporosidade e macroporosidade respectivamente. Pode-se observar que alguns dos valores de resistência apresentados na figura podem ser comparados tanto com a resistência à compressão do osso cortical (130 – 180MPa), quanto com a do osso trabecular (4 – 12 Mpa) (Wagoner Johnson e Herschler, 2011).

A microestrutura dos CFC favorece à formação de porosidade, conhecida como porosidade intrínseca. Os espaços entre os cristais precipitados aciculares estão numa faixa

de nanômetros, mas podem atingir diâmetros na ordem de micrometros (Ginebra *et al.*, 2012). Por convenção, a microporosidade compreende valores menores a uns poucos micrometros (Valle *et al.*, 2007). Pelo contrário, a macroporosidade, a qual é normalmente induzida para a fabricação de *scaffolds*, envolve valores de porosidade maiores a 100 μm (Xu *et al.*, 2004). Como apresentado na Figura 3.7, a macroporosidade é sobreposta sobre a microporosidade intrínseca de um cimento de fosfato de cálcio.

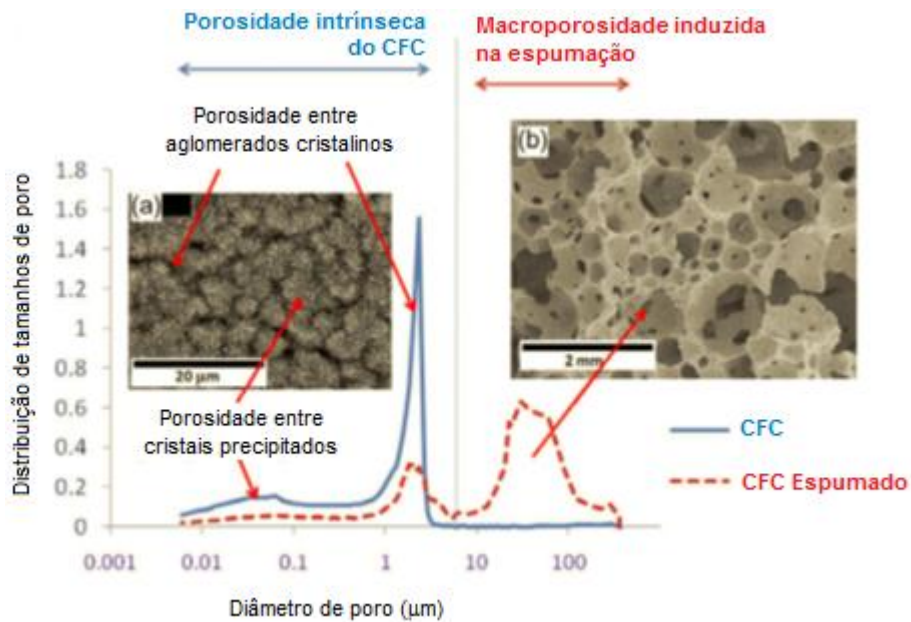


Fig. 3.7. Porosimetria de Inclusão de Mercúrio (MIP) de (a) CFC e (b) Espuma de CFC. Adaptado de (E. B. Montufar *et al.*, 2010).

Então a porosidade intrínseca de um cimento de fosfato de cálcio pode ser dividida em 2 tipos: o primeiro tipo é a nanoporosidade dada pelos espaços dos cristais precipitados e o segundo, que está na faixa de micrometros, que é causado pelos espaços entre as partículas aglomeradas do cimento (Montufar *et al.*, 2010). Como foi explicado anteriormente, os parâmetros do processo de fabricação estão diretamente ligados à microporosidade. A Figura 3.8 resume a influência do tamanho médio de partícula e a razão L/P da pasta.

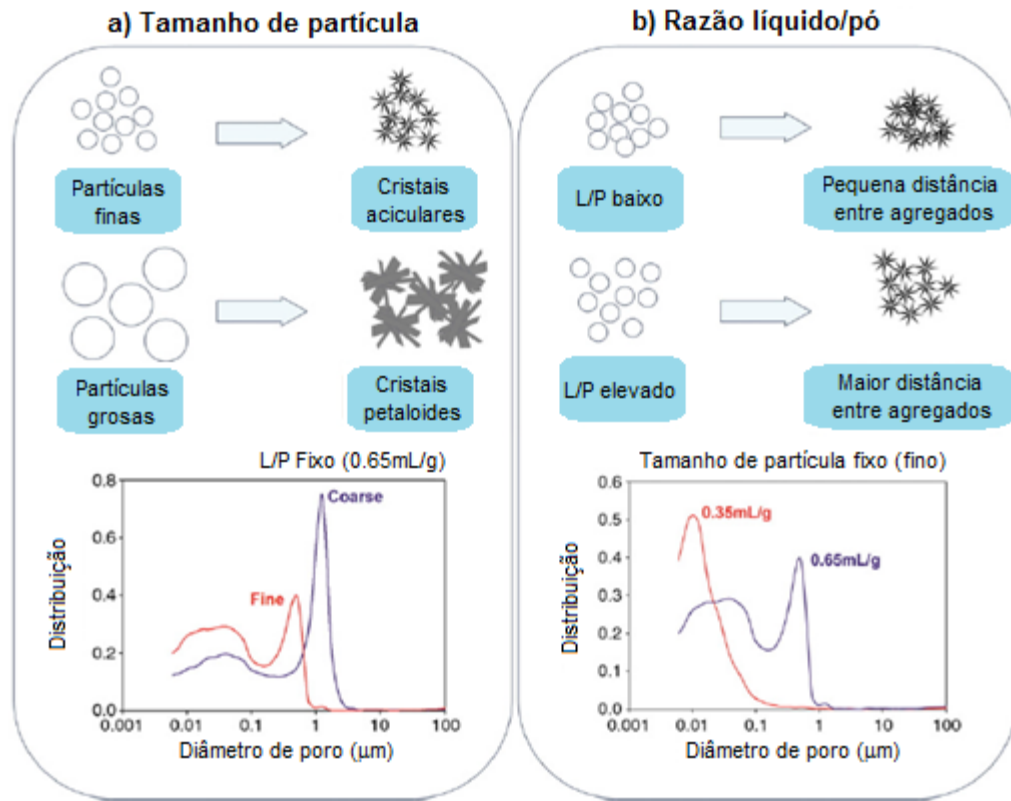


Fig. 3.8. Influência do tamanho de partícula e a razão L/P na porosidade intrínseca do CFC. Adaptado de (Ginebra *et al.*, 2012).

Por um lado, a utilização de partículas mais finas aumenta a área superficial do pó, isto é, aumenta a área de contato entre as partículas, reduzindo assim os espaços por causa de um maior empacotamento do pó cimentante. Além disso, a morfologia dos cristais de CaP precipitados depende do tamanho de partícula. Um pó fino favorece a precipitação de cristais em forma de agulha, enquanto um diâmetro maior produz cristais com morfologia petaloide, aumentando o espaço entre cristais. Por outro lado, ao diminuir a razão líquido/pó da pasta, as partículas de pó reduzem a distância entre elas, formando precipitados com menor espaçamento entre seus cristais.

3.2.3. Reabsorbilidade

Os produtos finais dos cimentos de fosfato de cálcio, DCPD e CDHA, são compostos solúveis em meios fisiológicos (Tabela 3.1). Esta característica é de grande importância na hora de avaliar a reabsorbilidade. A reabsorbilidade pode ser definida como um mecanismo

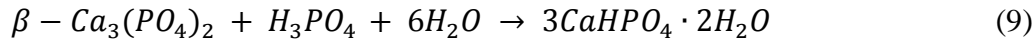
biológico pelo qual um material em ambiente fisiológico pode ser dissolvido parcial ou totalmente num período de tempo determinado. Este processo pode ser efetuado de duas formas diferentes. A primeira, chamada de reabsorção passiva, é causada pela interação do material com os fluidos orgânicos e depende da composição química do cimento endurecido, da sua porosidade e cristalinidade e do pH da interface entre a superfície do cimento e os tecidos. A segunda, chamada de reabsorção ativa, é ocasionada pela atividade celular de macrófagos ou osteoclastos, os quais produzem um pH em torno dos 5,5, acelerando a taxa de dissolução da superfície do cimento (del Real *et al.*, 2002). Os cimentos de Brushita, por serem mais solúveis do que os cimentos apatíticos (Tabela 3.1), são dissolvidos por mecanismos passivos, enquanto que os cimentos apatíticos são reabsorvidos principalmente por mecanismos ativos (Ginebra *et al.*, 2012).

Os mecanismos de reabsorção são normalmente acompanhados de crescimento de osso novo e idealmente a taxa de reabsorção deveria ser igual à taxa de formação de novo tecido ósseo para impedir a constituição de espaços ou brechas entre o cimento e o local de implante. Embora o DCPD e a CDHA são compostos solúveis, a reabsorção destes materiais é um processo lento. Isto é explicado, entre outras causas, pela ausência de poros interconectados no volume do material. Apesar que um aumento na porosidade total do cimento ocasiona uma redução drástica nas propriedades mecânicas, uma estrutura macroporosa interconectada é necessária para garantir uma maior taxa de reabsorção do material, além de guiar a formação de novo osso a través da estrutura do cimento (osteocondução). A proliferação celular é ajudada pela formação de vasos sanguíneos entre a estrutura do cimento, os quais permitem fornecer nutrientes e oxigênio, além de permitir o transporte de proteínas (Shepherd e Best, 2011).

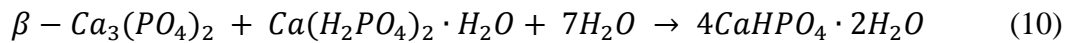
3.2.4. Cimentos de Brushita

Os cimentos de Brushita reagem para formar Fosfato Dicálcico Dihidratado (DCPD) como produto final. Lemaitre e colaboradores (Lemaitre, Mirtchi, e Mortier, 1987) apresentaram pela primeira vez em 1987 este tipo de cimentos. Até hoje tem sido avaliadas diferentes formulações deste cimento, entre as quais estão:

➤ β -TCP + Ácido Fosfórico



➤ β -TCP + Fosfato Monocálcico Mono-Hidratado (MCPM)



A reação de pega dos cimentos de Brushita baseia-se em interações ácido-base, onde, segundo a Tabela 3.1, o β -TCP de (9) e (10) é a fase básica e o Fosfato Monocálcico e o ácido fosfórico são os componentes ácidos da reação. Para precipitar DCPD, o pH da formulação deve estar num valor inferior a 6, pois, o DCPD é o fosfato de cálcio mais estável em pH menores de 4,2.

A Figura 3.9 apresenta o diagrama das isotermas de solubilidade dos ortofosfatos de cálcio em água a 37°C. O grau de solubilidade dos CaPs está relacionado com a concentração total dos íons de cálcio na solução saturada, em função do pH da mesma. A pendente negativa das isotermas indica que os ortofosfatos de cálcio aumentam sua instabilidade (solubilidade) com a diminuição do pH. Além disso, a pendente das isotermas é um indício de quão rapidamente aumenta a solubilidade dos sais de fosfato de cálcio com a diminuição do pH, onde os sais mais ácidos (MCPM, DCPD e DCPA) têm inclinações negativas menores do que os sais básicos (HA, β -TCP, α -TCP, OCP) (dos Santos, 2008). Assim, o diagrama da Figura 3.9 revela que, a partir de um pH aproximado de 4,2, o fosfato de cálcio mais estável é a Hidroxiapatita. A pesar de que o gráfico indica que o ortofosfato de cálcio mais estável a valores de pH < 4,2 é o DCP e não o DCPD, a Brushita é formada preferencialmente devido ao fato que a sua cinética de precipitação ser maior do que a da Monetita (DCPA) (Cama, 2014).

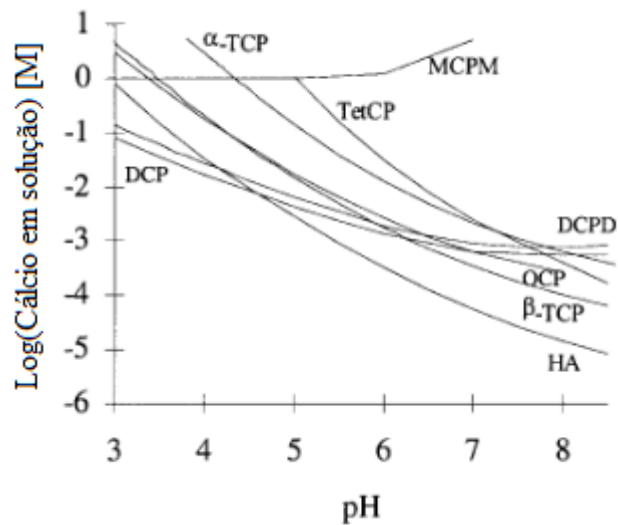


Fig. 3.9. Isotermas de solubilidade (log[Ca] vs pH) para os diferentes ortofosfatos de cálcio. Adaptado de (M. Bohner, 2001)

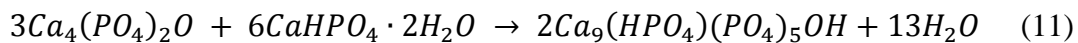
As formulações (9) e (10) são amplamente utilizadas dentro dos cimentos de Brushita por exibirem algumas vantagens como preparação fácil e rápida, ótimo controle da composição química e da reatividade e boas propriedades físico-químicas, como maiores tempos de pega e maiores resistências à tensão (Dorozhkin, 2009). Além disso, os cimentos de Brushita são em geral biocompatíveis e reabsorvíveis, pois o DCPD é um fosfato de cálcio com elevada solubilidade em soluções fisiológicas (Tabela 3.1). Entretanto, a utilização deste cimento representa também algumas desvantagens. Não só o DCPD pode ser precipitados apenas em soluções com pH menores a 6 (pasta cimentícia ácida) (Fig. 3.9), como também o pH da pasta pode variar desde valores muito ácidos (~2,5) até valores um pouco mais neutros (~6) durante o seu endurecimento. Assim, a biocompatibilidade da pasta pode ser diminuída durante a reação de pega no corpo, pois podem acontecer respostas de inflamação nos tecidos vizinhos ao implante (Dorozhkin, 2008). Outrossim, a elevada taxa de reabsorção do DCPD pode significar uma redução nas propriedades mecânicas no cimento nas primeiras horas no local de implante, além de possivelmente favorecer a formação de osso imaturo.

3.2.5. Cimentos apatíticos

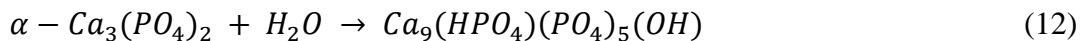
Os CFC apatíticos devem seu nome ao produto final da sua reação de pega que é Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio (CDHA). Como este fosfato de cálcio é formado em ambientes aquosos, exibe um menor grau de cristalinidade, em contraste com a Hidroxiapatita estequiométrica (Ca/P = 1,67), e por conseguinte a CDHA é química e estruturalmente similar à apatita biológica dos ossos e dentes. Como resultado a CDHA é altamente biocompatível.

Algumas das formulações mais estudadas destes cimentos incluem sais de α -TCP e TTCP como pós cimentantes:

- TTCP + DCPD (ácido-base)



- α -TCP (Hidrólise)



A formulação (11) procede tal como as reações dos cimentos de Brushita, isto é, os processos de dissolução e precipitação ocorrem por interações entre um sal básico (TTCP) e um sal ácido (DCPD). Esta reação ocorre em pH fisiológicos, logo o produto final mais estável, segundo o diagrama das isotermas de solubilidade (Fig. 3.9), é Hidroxiapatita. Pelo contrário, a reação (12) ocorre apenas com um sal de fosfato de cálcio (α -TCP), a qual é dissolvida por hidrólise do pó e precipitada em CDHA. Usa-se preferencialmente o sal de α -TCP em lugar de β -TCP pois a primeira é uma fase termodinamicamente mais instável e solúvel, sendo mais reativa. A Figura 3.10 resume as principais características dos cimentos de Brushita e Apatíticos com as suas formulações mais comuns.

		Cimento apatítico		Cimento de Brushita
		Único componente	Múltiplos componentes	
Reativos	α -TCP	TTCP + DCPA/DCPD	β -TCP + MCPM/MCPA	
Reação	$3\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	$2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O} + 2\text{CaHPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Tipo de reação	Hidrólise	Ácido - Base	Ácido - Base	
Mecanismo de pega e morfologia cristalina				

Fig. 3.10. Características dos CFC. Adaptado de (Ginebra *et al.*, 2012)

3.2.6. Cimentos de α -TCP

O processo de hidratação do sal de α -TCP para formar CDHA foi descrito pela primeira vez por Monma e Kanazawa (Monma e Kanazawa, 1976). A equação (12) descreve a hidrólise do α -TCP e a obtenção de CDHA, a qual à temperaturas fisiológicas é um processo lento. O tempo de pega destes cimentos é consideravelmente maior aos tempos dos cimentos de Brushita. A cinética da reação pode ser favorecida variando os parâmetros do processo descritos na seção 2.1. Ainda mais, podem ser usados diferentes aditivos na fase líquida, como por exemplo ortofosfatos solúveis (ácido fosfórico, MCPM, NaH_2PO_4 entre outros), os quais promovem a dissolução do pó cimentante pela acidificação do pH do sistema (Dorozhkin, 2009).

A hidrólise do α -TCP está controlada principalmente por dois mecanismos. Na etapa inicial, a reação está limitada pela área superficial do pó cimentante em contato com o líquido, enquanto a camada superficial de CDHA formada ao redor das partículas do pó inicial permita uma rápida difusão do líquido através da camada. Para isto, a capa de CDHA

deve ser fina, descontínua ou permeável ao transporte iônico. Quando a camada recobrir completamente a superfície das partículas e apresentar uma espessura maior, a taxa de difusão do líquido através da camada vai ser mais lenta do que a taxa de dissolução do sal de α -TCP, ou seja, o mecanismo de difusão vai começar a limitar a reação de hidrólise (Ginebra, Fernández, Driessens, e Planell, 1999).

3.3. Espumas

A espuma líquida é um sistema disperso, composto de bolhas de gás separadas por filmes de líquido, onde a fração volumétrica da fase gasosa está na faixa entre 0,5 e 0,97; se a fração em volume de gás for maior a 0,75, as bolhas sofrerão deformação por interações entre elas. O tamanho de bolha está geralmente entre 0,1 e 3mm, como resultado o número de bolhas por mililitro é de aproximadamente 1000 (Wilson, 1989).

A formação da espuma é possível num líquido com uma concentração determinada de um agente de atividade superficial, também chamado de surfactante (Lyon, 2002). Estes agentes são geralmente moléculas anfifílicas, ou seja, apresentam uma região hidrofóbica e outra hidrofílica. A introdução destes compostos na fase líquida muda significativamente as propriedades da dispersão: diminui a tensão superficial da interfase líquido/gás, devido ao fato que estas moléculas se adsorvem na interface, estabilizando a grande área interfacial formada graças à dispersão da fase gasosa no líquido e também reduzindo o tamanho médio das bolhas (Exerowa e Kruglyakov, 1997). Assim, uma espuma pode ser feita das seguintes maneiras (Lyon, 2002; Wilson, 1989):

- Por supersaturação da solução com gás, dissolvendo-o sob pressão para depois liberar essa pressão (bebidas carbonatadas) ou permitindo a formação *in situ* de gás por reação química (fermentação da massa de pão).
- Por ação mecânica, isto é, por agitação simples.

Ainda que a dispersão líquido/gás seja estabilizada pela ação de um surfactante, a espuma continua sendo um sistema termodinamicamente instável devido à sua elevada área interfacial, a qual aumenta consideravelmente a energia livre do sistema. Por esta razão,

depois da formação da espuma, acontecem fenômenos físicos visando à diminuição da energia livre e assim desestabilizando a espuma. A desestabilização pode tomar apenas alguns segundos ou horas, dependendo do surfactante ou outro aditivo utilizado (Studart *et al.*, 2006).

Logo que a espuma é formada, ocorre uma segregação por gravidade do líquido através dos filmes finos que separam as bolhas. Este fenômeno é chamado de drenagem gravitacional. Eventualmente as bolhas, de geometria esférica (Kugelschaum), vão se aproximar umas com as outras até o ponto de se deformar em geometrias poliédricas (Polyederschaum), separadas por filmes finos planos ou *lamellae*. A Figura 3.11(a) é uma representação gráfica da evolução das bolhas na espuma durante a etapa de drenagem.

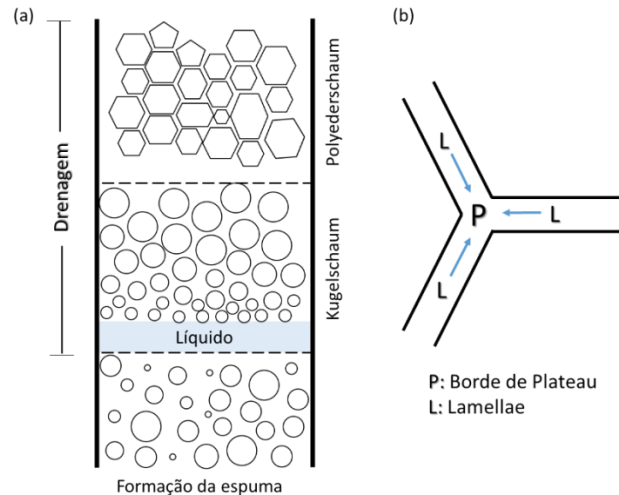


Fig. 3.11. (a) Processo de drenagem da espuma. (b) Filmes finos de líquido e borde de plateau. Adaptado de (Lyon, 2002)

Com a drenagem a proporção de líquido presente na espuma diminui, reduzindo assim a espessura dos filmes que separam as bolhas. A diferença de pressão entre o borde de plateau (intersecção de 3 *lamellae*) e os filmes finos ($P_P < P_L$) favorece a sucção capilar do líquido em direção ao borde de plateau (Fig. 3.11(b)), diminuindo a distância entre as bolhas até concluir na coalescência de bolhas vizinhas. Tanto a drenagem quanto a coalescência da espuma podem ser evitadas agregando aditivos na dispersão, por exemplo surfactantes ou partículas adsorvidas na interface líquido/gás. No entanto, raramente as espumas podem resistir o

envelhecimento da mesma, conhecido como maturação de Ostwald (Stuart *et al.*, 2006). A força motriz deste fenômeno é a diferença de pressões entre bolhas vizinhas de diferente tamanho. A maturação da espuma consiste então na difusão de gás desde as bolhas menores para as maiores. Como resultado, as bolhas menores tendem a desaparecer, enquanto as maiores aumentam seu tamanho (Fig. 3.12).

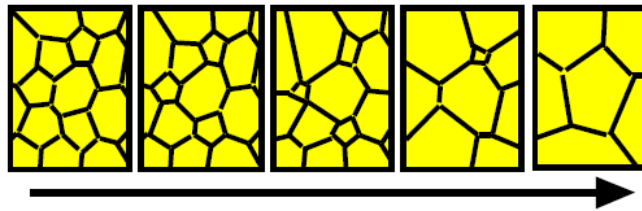


Fig. 3.12. Processo de maturação de Ostwald. (Salager, Andérez, e Forgiarini, 2003)

3.3.1. Surfactantes

Um surfactante é um composto químico de natureza anfifílica, isto é, apresenta uma região polar hidrofílica e uma região apolar hidrofóbica ou lipofílica. Em virtude do anterior, este tipo de compostos tendem a se adsorver em superfícies ou interfaces, formando monocamadas orientadas, onde cada região da molécula anfifílica interage no ambiente da sua afinidade. A adsorção destas moléculas afeta diretamente as propriedades da interface, diminuindo a energia superficial associada à interface líquido/gás e aumentando a viscosidade interfacial. Como resultado, a dispersão de ar numa solução é estabilizada.

Numa solução aquosa com uma pequena concentração de surfactante as moléculas do composto tendem a se adsorver na interface ar/solução (Fig. 3.13) para evitar interações energeticamente desfavoráveis entre a cauda apolar (região hidrofóbica) e a solução. Com o incremento da concentração de surfactante a tensão superficial diminui devido ao aumento de moléculas de surfactante adsorvidas até chegar ao ponto em que a superfície é completamente saturada, formando uma capa fina de surfactante na interface. A partir daí, o aumento da concentração de surfactante não reduzirá a tensão superficial. Esse ponto é chamado de concentração micelar crítica (CMC) e depende de fatores como a temperatura, pressão, natureza do surfactante (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e presença de outros

aditivos. Uma vez atingida a CMC, as moléculas monoméricas vão se associar espontaneamente formando agregados moleculares esféricos conhecidos como micelas, onde as caudas apolares estão rodeadas de uma capa composta pelas cabeças polares (Chakraborty, Chakraborty e Ghosh, 2011). A CMC é de grande importância na hora de analisar o comportamento de uma solução com uma concentração de surfactante, já que as propriedades físico-químicas da solução variam fortemente dependendo se a concentração de surfactante estiver acima ou abaixo da CMC.

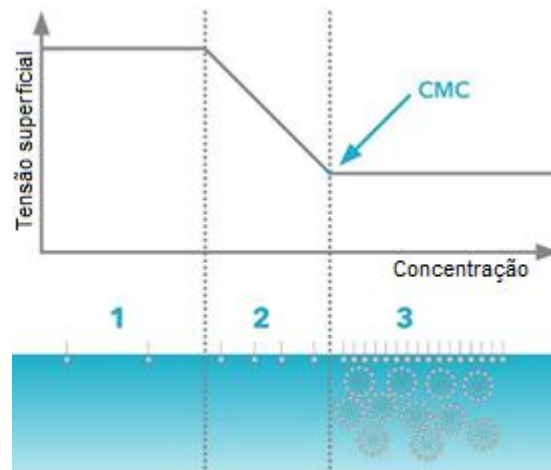


Fig. 3.13. Influência da concentração do surfactante na tensão superficial e na formação micelar (Scientific, 2014).

3.3.1.1. Classificação dos surfactantes

A classificação dos surfactantes é determinada com base na natureza da cabeça polar da molécula. Assim, os surfactantes se classificam da seguinte maneira:

- **Aniônicos:** É o tipo de surfactante mais usado e fabricado industrialmente pelo baixo custo de processamento. Pode ser encontrado praticamente em qualquer detergente. Está composto de uma cadeia hidrocarbonada hidrofóbica e uma cabeça polar hidrofílica dissociada em uma parte aniônica (RCOO^- , RSO_3^- , ROSO_3^-) e uma parte catiônica, geralmente um metal alcalino ou um cátion quaternário de amônio.

- Não-Iônicos: Os surfactantes não-iônicos não apresentam grupos com carga elétrica, já que a parte hidrofílica da molécula está composta por grupos que não são ionizados em solução aquosa. Geralmente são grupos alcoólicos, fenólicos, éter ou amida. Por outro lado, a parte hidrofóbica da molécula é comumente um radical alquilo ou um alquilbenzeno ou um ácido graxo.
- Catiônicos: São os surfactantes menos comuns devido ao elevado custo da produção. São chamados de catiônicos, pois um ou mais grupos funcionais da molécula se ionizam fornecendo íons orgânicos carregados positivamente. A maioria dos surfactantes catiônicos baseiam-se em moléculas nitrogenadas, enquanto que as outras são compostos baseados em fósforo e enxofre.

3.3.1.2. Lauril Sulfato de Sódio

O Lauril Sulfato de Sódio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) é um surfactante aniônico do tipo sulfato alquilo. A molécula deste surfactante está composta por uma cadeia de 12 carbonos ligados a um grupo sulfato. Entre as principais aplicações deste agente espumante estão a fabricação de shampoos, dentífricos e detergentes. As principais propriedades físicas e químicas do Lauril Sulfato de Sódio estão apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Propriedades físicas e químicas dos surfactantes Lauril Sulfato de Sódio e Lutensol ON 110.

	Lauril Sulfato de	
	Sódio	Lutensol ON 110
Estado físico (20°)	Sólido	Líquido
Cor	Branco	Incolor
pH	8,5 - 10	~7
Ponto de Fusão	206°C	15°C
Massa Molar	288 g/mol	680 g/mol
Densidade (20°C)	1,1 g/cm ⁻³	1,03 g/cm ⁻³
Solubilidade em água (20°C)	150 g/L	Total

3.3.1.3. *Lutensol ON 110*

Lutensol ON 110 é um surfactante não iônico. Sua fórmula química é $RO(CH_2CH_2O)_{11}H$, onde R representa um álcool graxo saturado de cadeia curta. É um alquil polietilenoglicol éter. É aplicado geralmente em detergentes industriais, produtos de limpeza doméstica. Suas principais propriedades físicas e químicas estão apresentadas na Tabela 3.2.

3.4. Engenharia de tecidos

Um dos maiores problemas da medicina atual é a falha das funções ou perda total dos diferentes órgãos do corpo humano. Devido à carência de doadores e à sua escassez em bancos que pudessem satisfazer a necessidade dos pacientes, foi imperativo o desenvolvimento de estratégias que melhorarem a sua qualidade de vida. A engenharia de tecidos surgiu como uma dessas estratégias, sendo um área interdisciplinar que combina os princípios da engenharia e das ciências naturais com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar funções dos tecidos (Langer e Vacanti, 1993).

3.4.1. Engenharia de tecido ósseo

O incremento na expectativa de vida, nos acidentes, na obesidade, entre outros fatores, aumentou a demanda mundial de soluções para traumas ortopédicos e buco-maxilo-faciais. Como resultado, o osso é o segundo tecido mais transplantado no mundo (Frost e Sullivan, 2007). Existem vários tipos de transplantes ósseos:

- Enxerto alógeno: é um transplante de osso procedente de outra pessoa. Este enxerto apresenta a vantagem de ser química- e estruturalmente igual ao osso do paciente, além de ser osteocondutor. No entanto, as suas desvantagens dificultam a sua utilização. Entre as desvantagens estão: poucos doadores, elevado custo, risco de contágio de doenças e ausência células e proteínas que favorecem o crescimento de novo osso (Rose e Oreffo, 2002).
- Enxerto autógeno: Implante de enxerto ósseo procedente do mesmo paciente. Em contraste com o enxerto alógeno, não tem risco de transmissão de doenças ou rejeição

pelo sistema imunológico, embora favorece a formação ativa do osso vivo. A principal desvantagem deste enxerto é a necessidade de 2 intervenções cirúrgicas, além da quantidade limitada e tamanho do enxerto, o que evita o uso em todos os casos de necessidade de implante.

- Enxerto Aloplástico: Enxerto de origem sintético. As vantagens deste tipo de enxertos são: ausência de formas patogênicas e outras doenças, versatilidade na geometria ou morfologia do enxerto, fonte quase inesgotável de matéria prima, similaridade química com o componente mineral do osso e osteocondução. Contudo, o controle pouco rigoroso do processamento evita uma reprodutibilidade das características físico-químicas do composto.

A rejeição do implante pelo sistema imunológico, a morbidade no sitio doador e o custo dos procedimentos são as principais desvantagens dos enxertos alógenos e autógenos (Langer e Vacanti, 1993), de tal forma que estudos na engenharia de tecido ósseo estão sendo focados no desenvolvimento e utilização de materiais e substâncias sintéticas como substitutos ou favorecedores do crescimento de tecido ósseo. Os *scaffolds*, por exemplo, são modelos bi- ou tridimensionais fabricados a partir de materiais biocompatíveis

3.4.1.1. *Scaffolds de cimento de fosfato de cálcio*

Os primeiros estudos sobre o uso de cimentos de fosfato de cálcio como *scaffolds* na engenharia de tecidos foram publicados por Yoshikawa e colaboradores (Yoshikawa, Suwa, Ohgushi, Tamai, e Ichijima, 1996). Os autores induziram macroporosidade ao cimento através da adição de sacarose, obtendo um material com uma porosidade de 60%. O cimento macroporoso foi cultivado com células estromais e posteriormente implantado subcutaneamente em ratos durante 6 semanas. Foram reportados padrões similares na formação de novo osso em todos os portadores. Em virtude destes resultados, aumentou o interesse da comunidade científica na utilização dos cimentos de fosfato de cálcio como materiais que induzem e guiam o crescimento de novo tecido ósseo.

Os procedimentos para induzir macroporosidade nos cimentos de fosfato de cálcio são geralmente os mesmos utilizados para obter cerâmicas macroporosas. Dentre estas técnicas se encontram principalmente métodos de réplica, sacrifício de agentes porogênicos, prototipagem rápida e espumação direta. Assim, a porosidade no cimento pode ser induzida antes do endurecimento, ou seja quando o material tem a consistência de uma pasta ou depois da pega, isto é, depois do rigidização da pasta

A réplica é um dos métodos mais amplamente utilizados para induzir macroporosidade em materiais cerâmicos, pois é uma técnica simples, de baixo custo e versátil. A técnica pode ser direta (positiva), isto é, replicar a macroporosidade de uma espuma rígida sintética ou natural. Ela deve ser mergulhada na suspensão cerâmica (pasta cimentícia), a qual deve apresentar propriedades reológicas aptas tanto para um revestimento ideal no molde, quanto para evitar o vazamento total da suspensão na hora de eliminar o excesso (Stuart *et al.*, 2006). Após a imersão, a peça deve ser calcinada numa temperatura que permita a remoção do molde inicial. Esta é uma das desvantagens deste processamento na hora de incorporar macroporosidade num cimento de fosfato de cálcio, já que a elevada temperatura aumenta a cristalinidade do material, diminuindo a similitude estrutural com o componente mineral dos ossos e assim, diminuindo a solubilidade da biocerâmicas no organismo (Ginebra *et al.*, 2010) (Jiménez, 2010). Por outra parte, a réplica também pode ser indireta ou negativa, onde a pasta cimentícia é introduzida num molde, o qual é removido após a reação de pega com ajuda de um solvente orgânico. A principal desvantagem deste procedimento é a possível toxicidade do solvente usado, além da dificuldade da remoção total do material do molde, o qual pode ser potencialmente adverso no organismo. Miao e colaboradores (Miao *et al.*, 2004) obtiveram *scaffolds* de cimento de fosfato de cálcio replicando a estrutura de uma espuma de poliuretano. Após a imersão da espuma e a pega do cimento, a peça foi calcinada a 1200°C por 2 horas. Devido ao da calcinação mudar as propriedades inerentes ao endurecimento do cimento e impossibilita a incorporação de medicamentos, os autores reportaram mais uma imersão da peça depois da calcinação. Os arcabouços obtidos apresentaram uma porosidade de aproximadamente 70%, além de micro e macroporos interconectados (Fig. 3.14(a)).

Outrossim, o sacrifício de agentes porogênicos é outra técnica amplamente utilizada para gerar macroporosidade nos cimentos de fosfato de cálcio. Consiste na adição de partículas, fibras ou malhas antes, durante ou depois da preparação da pasta cimentícia. Assim, tanto o grau de porosidade e interconectividade, quanto a distribuição de tamanho dos poros dependem do tamanho e fração em volume dos agentes porogênicos (Ginebra *et al.*, 2010). Dentre os compostos granulares mais estudados estão a sacarose, o manitol, NaHCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e Na_2HPO_4 . Além disso, tem sido avaliada a influência da adição de microesferas ou fibras de polímeros reabsorvíveis, tais como o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poliácido láctico (PLA), policaprolactona (PCL) ou gelatina. A dissolução do material de sacrifício e posterior formação de macroporosidade do cimento pode acontecer antes de ser implantado *In Vivo*, dependendo da solubilidade do agente porogênico (Ginebra *et al.*, 2010). A formação de macroporosidade antes da implantação obriga ao cirurgião a adaptar a cavidade ao *scaffold*. Contudo, no outro caso, a colonização celular não pode acontecer até a formação da macroporosidade *In Vivo*. Outra desvantagem deste método é a necessidade de acrescentar grandes quantidades de agentes porogênicos para obter *scaffolds* com porosidade e interconectividade apropriados, o qual pode decrementar não só as características biocompatíveis e bioativas do cimento, bem como sua injetabilidade (Ginebra *et al.*, 2010) (Jiménez, 2010). Xu e colaboradores (Xu, Weir, Burguera, e Fraser, 2006) acrescentaram manitol como agente porogênico (0 – 50 wt%) num cimento apatítico (TTCP + DCPD). O tempo de pega aumentou significativamente com a adição de manitol no cimento e a injetabilidade diminuiu drasticamente para os cimentos com 50 wt% de agente porogênico. A porosidade obtida esteve na faixa de 64 – 82%, mas as micrografias de MEV não confirmaram a interconectividade dos macroporos (Fig. 3.14(b)).

A prototipagem rápida é uma metodologia desenvolvida nos últimos anos que permite o desenvolvimento de peças complexas por softwares de processamento de imagens. É composta por vários tipos de técnicas, entre as quais estão a impressão 3D, a modelagem por fusão e deposição, a sinterização seletiva a laser, entre outras. Embora as três técnicas mencionadas são amplamente utilizadas para a fabricação de *scaffolds* para a engenharia de tecidos, apenas a impressão 3D é apropriada para o processamento do cimento de fosfato de cálcio, pois vale-se da reação de endurecimento *In Situ* do material ao injetar a fase líquida

sobre a camada de pó. A impressão 3D é uma técnica que permite um controle preciso da geometria do *scaffold*, por conseguinte a reprodutibilidade inerente do processo é elevada. Além do anterior, a técnica possibilita a incorporação de aditivos no cimento, por exemplo medicamentos, proteínas e inclusive células (Ginebra *et al.*, 2010). No entanto, a principal desvantagem da impressão 3D é impossibilidade de moldar ou injetar o cimento. Num estudo desenvolvido por Habibovic e colaboradores (Habibovic *et al.*, 2008), os autores preparam *scaffolds* de cimento de Brushita e Monetita com diferentes geometrias de peça e poro, com porosidade superficial aberta ou fechada para ser implantadas intramuscularmente e em vértebras lombares de cabras, com a finalidade de avaliar o efeito da porosidade aberta e fechada na formação de novo osso. Os autores não encontraram evidências que demonstrasse uma influência significativa da porosidade aberta superficial na formação inicial de osso. Entretanto, os implantes intramusculares apresentaram formação de osso nos implantes, o qual evidencia o caráter osteoindutivo dos cimento de brushita e monetita.

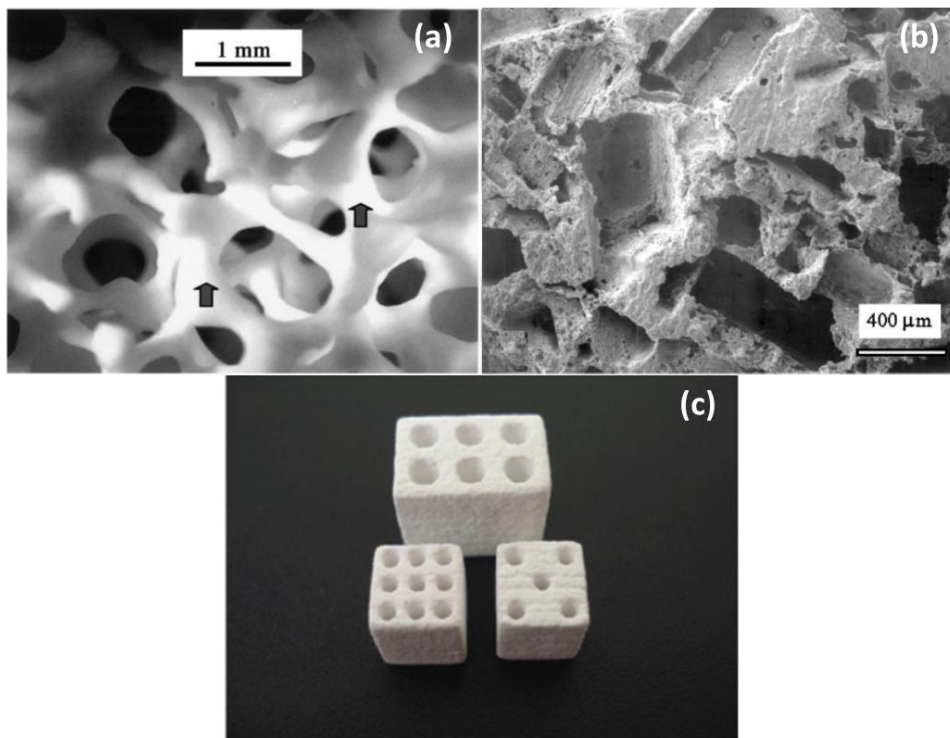


Fig. 3.14. Macroporosidade de cimentos de fosfato de cálcio obtida por diferentes métodos. (a) Réplica de uma espuma de poliuretano. (b) Sacrifício de manitol como agente porogênico. (c) Impressão 3D.

Por outro lado, a espumação direta é uma metodologia aplicada em suspensões cerâmicas, introduzindo ar no meio para produzir um sistema disperso. Dado que o sistema resultante é instável termodinamicamente devido à elevada área superficial da suspensão, o processo deve ser continuado pelo endurecimento ou solidificação do material para evitar o colapso da espuma e assim manter a estrutura macroporosa. No caso dos cimentos de fosfato de cálcio, o tempo inicial de pega deve acontecer antes da desintegração da estrutura espumada. Assim, a porosidade total do material é diretamente proporcional ao volume de ar incorporado durante o processo e, por outro lado, o tamanho do poro é função da estabilidade da espuma antes do endurecimento (Stuart *et al.*, 2006). Em virtude do anterior, são acrescentados agentes espumantes para estabilizar o sistema. No caso dos *scaffolds*, o surfactante deve ser biocompatível e solúvel em água (Ginebra *et al.*, 2010).

Foram avaliados diferentes tipos de surfactantes na literatura (Tabela 3.3), entre os quais se encontram surfactantes a base de proteínas, como a gelatina e a albumina. Este último é uma combinação de proteínas que compõem a clara do ovo. Ginebra e colaboradores (Ginebra *et al.*, 2007) obtiveram uma pasta cimentícia a partir de pó de α -TCP e água destilada ou uma solução de Na_2HPO_4 (2,5%) com uma relação líquido/pó de 0,35mL/g. A pasta foi depois misturada com uma solução de albumina (12 wt%), a qual foi previamente espumada numa batedeira. Os cimentos obtidos apresentaram uma porosidade total de 56 – 77% e uma macroporosidade na faixa de 12,9 – 56,1%, onde as amostras fabricadas sem a presença de Na_2HPO_4 na solução exibiram maior macroporosidade do que as amostras produzidas com o acelerante. Isto foi atribuído ao pH básico do fosfato de sódio, já que a estabilidade da espuma de albumina é maior em pH perto de 5. Além disto, não foram encontradas evidências que demonstrarem uma influência da albumina na transformação de α -TCP a CDHA. A Figura 3.15(a) apresenta uma amostra de cimento fabricada a partir de água destilada e espuma de albumina.

Como alternativa aos surfactantes a base de proteínas são empregados surfactantes sintéticos de baixo peso molecular. Estes compostos tem a vantagem de não gerarem respostas imunogênicas no organismo. Montufar e colaboradores (Montufar E. B. *et al.*, 2010) desenvolveram amostras macroporosas de cimento de α -TCP, misturando o pó

cimentício com um volume determinado de uma solução de Na₂HPO₄ (2,5%) e Tween 80 (0 – 20 wt%), a qual foi previamente espumada numa batedeira por 1 minuto a 11000 rpm. Os autores utilizaram diferentes relações líquido/pó (L/P), isto é, 0,32, 0,38, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55 e 0,65 mL/g. O Tween 80 é um surfactante não-iônico solúvel em água e aprovado pela FDA para o uso parenteral (Montufar E. B. *et al.*, 2011). Primeiramente, foram avaliadas a espumabilidade e estabilidade das soluções com diferentes concentrações de surfactante. Segundo os resultados obtidos, a espumabilidade não variou significativamente em função da concentração de surfactante, pois todas estão acima da concentração crítica micelar (CMC) do Tween 80 em água. Em contraste, a estabilidade aumentou significativamente, o qual foi atribuído ao aumento da viscosidade da solução com o aumento na concentração de surfactante. O estudo continuou então apenas com concentrações de 0,5 e 5% de Tween 80. Contudo, a porosidade e macroporosidade obtidas não apresentaram variações representativas com respeito da concentração de Tween 80. A relação líquido/pó, pelo contrário, teve uma influência importante nesses parâmetros, onde o aumento do volume de solução resultou num incremento da porosidade. Os valores para a porosidade e macroporosidade das amostras são apresentadas na Tabela 3.3. Os autores reportaram valores na faixa de 60,2 – 75,8% de porosidade e 18,9 – 44,4 de macroporosidade. Outrossim, os valores reportados da resistência à compressão das amostras foram 0,2 – 18,3Mpa. A Figura 3.15(b) exhibe um arcabouço de cimento de fosfato de cálcio espumado com uma solução de 5% de Tween 80 com uma relação L/P de 0,65mL/g.

Tabela 3.3. Porosidade total, macroporosidade e resistência à compressão de cimentos de fosfato de cálcio macroporosos fabricados por espumação direta.

Referência	Cimento	Surfactante	Porosidade Total (%)	Macroporosidade (%)	R. à Compressão (Mpa)
(Ginebra <i>et al.</i> , 2007)	α -TCP	Albumina	56 - 77	12,9 - 56,1	0,47 - 8,17
(Edgar B. Montufar <i>et al.</i> , 2011)	α -TCP	Gelatina	63,9 - 73,2	15,5 - 36,8	-
(E. B. Montufar <i>et al.</i> , 2010)	α -TCP	Tween 80	60,2 - 75,8	18,9 - 44,4	0,2 - 18,3

(Unosson, Montufar, Engqvist, Ginebra, e Persson, 2015) (Sarda, Nilsson, Balcells, e Fernández, 2003) (de Oliveira Renó, Pereta, Bertran, Motisuke, e de Sousa, 2014)	β -TCP + MCPM	Tween 80	30 - 76,3	30 - 56	1 - 5,8
	α -TCP	Lauril S. Sódio	40 - 50	5 - 17	8 - 23
	β -TCP	Lutensol 110	62	-	1,2 - 1,5

O uso de surfactantes iônicos para induzir macroporosidade em cimentos de fosfato de cálcio também tem sido reportado na literatura. Sarda e colaboradores (Sarda *et al.*, 2003) avaliaram a influência do lauril sulfato de sódio, um surfactante aniônico, na macroporosidade de cimentos de α -TCP. Os autores fabricaram as amostras de cimento misturando o pó de α -TCP com uma solução de Na_2HPO_4 (2,5%) e diferentes concentrações de lauril (4,3, 8,7, 17,3, 34,7, 173,3 e 346,7 mM) utilizando duas relações L/P (0,32mL/g e 0,40mL/g). Em contraste com a metodologia de Montufar (2010), os autores fabricaram a pasta com a solução aquosa, isto é, sem espumá-la previamente. Como resultado, as amostras obtidas exibiram porosidades na faixa de 40-50% (Tabela 3.3), onde os cimentos feitos com a relação L/P de 0,32mL/g apresentaram valores de porosidade menores. Assim também, a macroporosidade obtida pelos autores exibiram valores muito inferiores aos obtidos nos outros estudos (5-17%). Por conseguinte, os valores da resistência à compressão desses cimentos foram maiores do que os reportados pelos outros autores. A Figura 3.15(c) exhibe a micrografia do cimento de α -TCP fabricado com uma solução de 346,7mM de lauril (L/P=0,40mL/g).

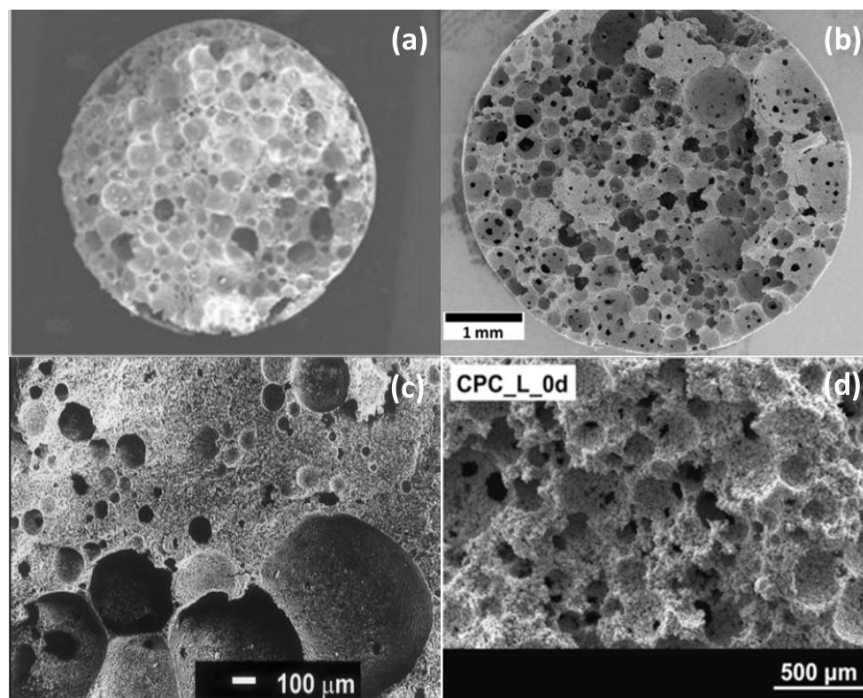


Fig. 3.15. Cimento de fosfato de cálcio espumado com (a) Albúmen, (b) Tween 80, (c) Lauril Sulfato de Sódio e (d) Lutensol ON 110.

De Oliveira e colaboradores (de Oliveira Renó *et al.*, 2014) espumaram um cimento de β -TCP, misturando o pó com uma solução com concentração de 0,02wt% de Lutensol ON 110, a qual foi previamente espumada num agitador mecânico. A pasta cimentícia foi misturada manualmente com uma espátula e com uma relação líquido/pó utilizada foi 0,80 mL/g. As amostras apresentaram uma porosidade de 62% e uma resistência à compressão na faixa de 1,2 – 1,5 MPa (Tabela 3.3), evidenciando a viabilidade de pequenas quantidades Lutensol ON 110, um surfactante não-iônico, para a estabilização de espumas cerâmicas. A Figura 3.15(d) apresenta a micrografia correspondente ao cimento de β -TCP espumado com uma solução de Lutensol ON 110.

Em suma, a revisão bibliográfica deixa algumas conclusões relevantes para o presente trabalho: É possível obter estruturas porosas de cimento de fosfato de cálcio, adicionando-se compostos estabilizantes da dispersão sólido/ar. No entanto, a forma como são misturadas as fases sólida e líquida é determinante na porosidade final do cimento, isto é, são obtidas amostras com maior macroporosidade e interconectividade se o pó cimentício é misturado

com a fase líquida previamente espumada (Fig. 3.16). Assim, a espuma atua como molde, permitindo a solidificação do cimento ao redor das bolhas, obtendo como resultado uma estrutura rígida altamente porosa.

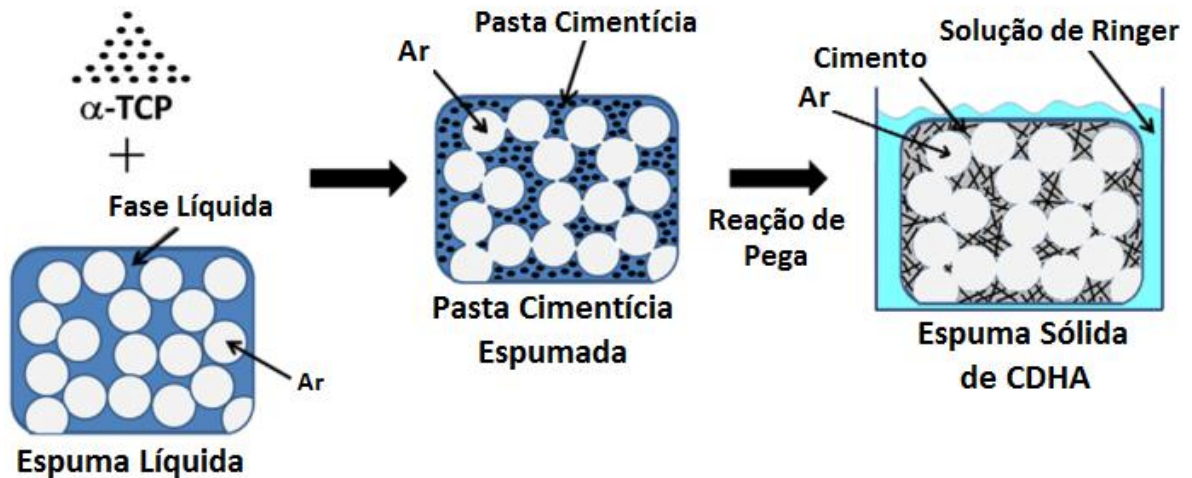


Fig. 3.16. Representação esquemática da preparação de uma espuma de cimento de fosfato de cálcio. (E. B. Montufar *et al.*, 2010).

Outro aspecto importante é a diminuição das propriedades mecânicas dos corpos de prova avaliados na literatura. Os valores de resistência à compressão para as amostras mais porosas (77, 76,3 e 75,8%) foram de 0,47, 0,2 e 1Mpa, respectivamente. Como foi explicado na Secção 3.2.2, as propriedades mecânicas dos materiais cerâmicos são altamente sensíveis à presença de porosidade. Aumentar a porosidade total do cimento resultará num decaimento da resistência à compressão do material.

Finalmente, a espumação da fase líquida reportada na literatura foi sempre realizada com a ajuda de um dispositivo mecânico, como uma batedeira ou um agitador, o qual dificulta a possível preparação manual na sala de cirurgia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia do presente trabalho foi dividida em 5 fases, as quais estão resumidas no diagrama da Figura 4.1.

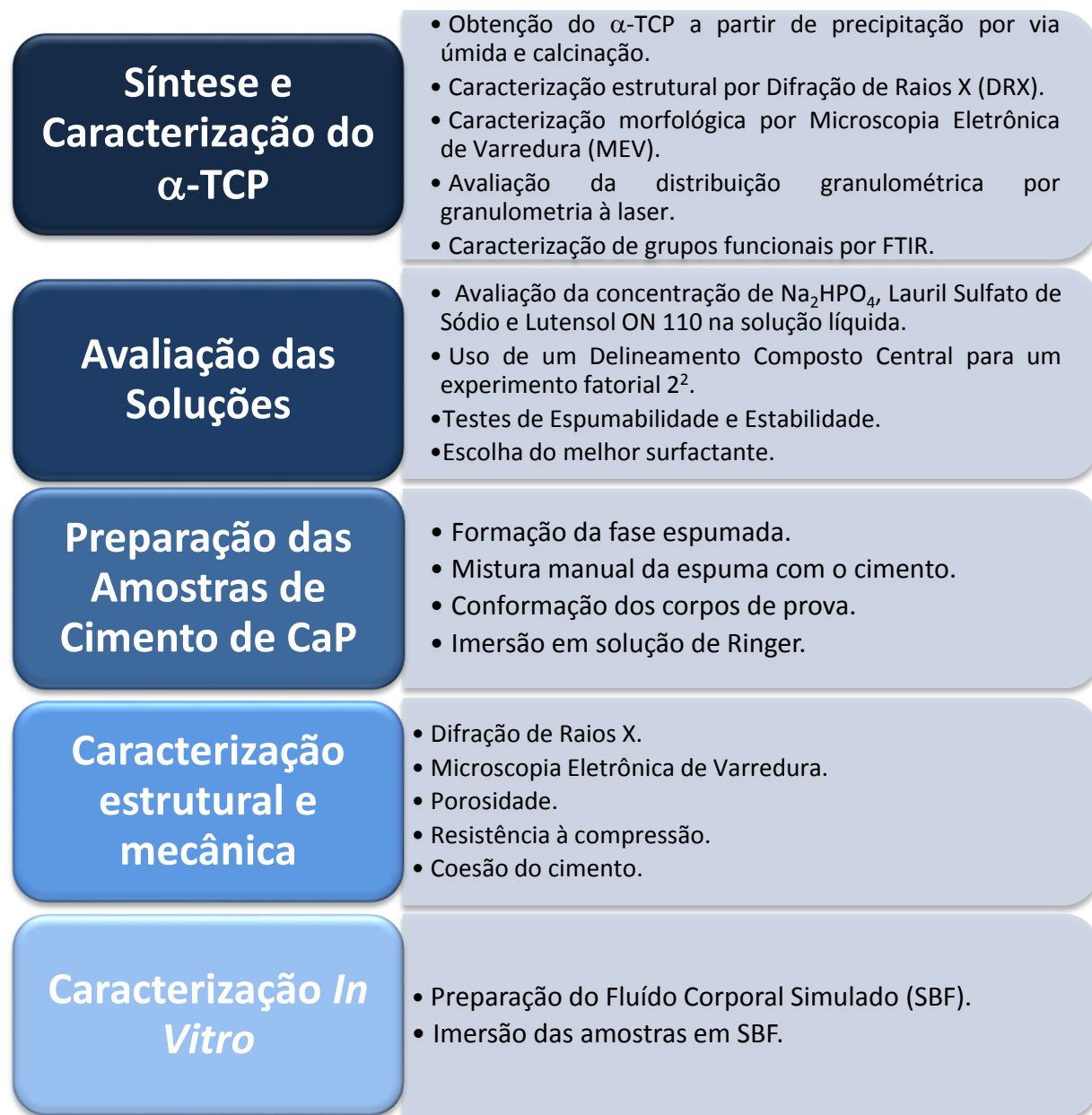


Fig. 4.1. Metodologia proposta para desenvolvimento do trabalho de pesquisa.

4.1. Materiais utilizados

Foram utilizados neste trabalho os seguintes materiais:

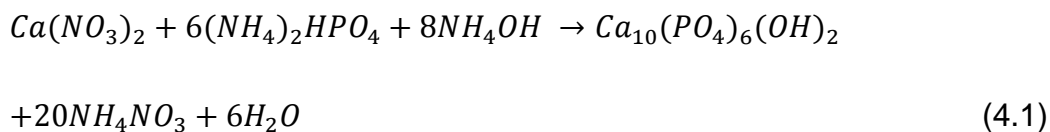
- Ácido Clorídrico 37% (HCl). Synth, P.A.-ACS.
- Álcool Etilico 99% (C₂H₆O). Química Moderna, P.A-ACS.
- Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃). Vetec, P.A.-ACS.
- Cloreto de Cálcio dihidratado (CaCl₂ · 2H₂O). Dinâmica, P.A.
- Cloreto de Magnésio Hexahidratado (MgCl₂ · 6H₂O). Vetec. P.A-ACS.
- Cloreto de Potássio (KCl). Vetec, P.A.
- Cloreto de Sódio (NaCl). Vetec, P.A.
- Fosfato de Amônio Dibásico ((NH₄)₂(HPO)₄). Dinâmica, P.A.
- Fosfato de Potássio Dibásico Trihidratado (K₂HPO₄ · 3H₂O). Vetec, P.A.
- Hidrogenofosfato de Sódio dodecahidratado (Na₂HPO₄ · 12H₂O). Synth, P.A.-ACS.
- Lauril Sulfato de Sódio (C₁₂H₂₅NaO₄S). Dinâmica, P.A.
- Lutensol® ON 110 (RO(CH₂CH₂O)₁₁H). BASF, P.A.-ASC.
- Nitrato de Amônio (NH₄NO₃). Vetec, P.A.
- Nitrato de Cálcio Tetrahidratado (Ca(NO₃)₂ · 4H₂O). Sigma Aldrich, P.A.
- Sulfato de Sódio Anidro (Na₂SO₄). Synth, P.A.
- Tris-hidroximetil Aminometano ((HOCH₂)₃CNH₂). Sigma Aldrich, ACS.

4.2. Síntese do α -TCP

A síntese do α -TCP foi realizada empregando o método de precipitação por via úmida de uma fase precursora, utilizando precursores com concentrações de [Ca²⁺] e [PO₄³⁻] definidas, mantendo a relação Ca/P em 1,5, seguido da calcinação do precipitado em forno.

O procedimento consistiu numa reação ácido-base, onde a solução de hidrogenofosfato de amônio [(NH₄)₂(HPO)₄, 0,5M] foi adicionada com uma taxa de gotejamento de aproximadamente 14 mL/min à solução de nitrato de cálcio [Ca(NO₃)₂, 0,5M], a qual foi previamente aquecida em um balão de fundo redondo de três bocas até uma temperatura de 60°C sob constante agitação a 170 rpm (Figura 4.2).

A determinação das quantidades de sais a utilizar foi feita a partir da reação descrita a seguir.



Na equação observa-se que é obtido nitrato de amônio (NH_4NO_3) como subproduto da reação, o qual diminui ou acidifica o valor do pH da solução. Tanto o pH quanto a temperatura são parâmetros críticos na precipitação do pó precursor com a estequiometria ideal para obter α -TCP após a calcinação. Por esta razão é indispensável um controle cuidadoso destes parâmetros durante o processo. Por conseguinte, visando a estabilização do pH durante a mistura, foram adicionados 10mL de hidróxido de amônio (NH_4OH) ao balão em duas etapas: antes de começar a mistura foram acrescentados os primeiros 5mL do composto e após 15 minutos do gotejamento foram agregados os últimos 5mL da base. Como resultado o valor do pH da mistura foi mantido entre 7 e 8. Os parâmetros do processo são apresentados na Tabela 4.1.



Fig. 4.2. Sistema de mistura utilizado na precipitação do pó de CaP. Composto por manta elétrica, balão de fundo redondo de 3 bocas, termopar, agitador elétrico e funil de decantação.

Após a mistura e homogeneização das soluções, o produto obtido permaneceu no balão de destilação durante 20 horas sem agitação e à temperatura ambiente. Depois deste tempo o pó precipitado foi filtrado sob vácuo com um funil de Büchner e posteriormente

secado em estufa a 100°C, durante 24 horas. Após do processo de secagem, o material foi triturado manualmente em um almofariz de porcelana. O pó foi então transferido para um cadinho de alumina e levado a um forno convencional, onde foi tratado termicamente a 1400°C por uma hora. A taxa de aquecimento foi de 5°C/min; depois do patamar, o pó permaneceu dentro do forno até atingir a temperatura ambiente. Finalmente, o material foi moído novamente em almofariz e peneirado em malha #325.

Tabela 4.1. Parâmetros do processo da precipitação via úmida.

Concentração dos reagentes	Relação Ca/P dos reagentes	Volume total da solução	pH da mistura	Temperatura de processo	Velocidade rotacional de agitação	Vol. Amônia (mL)
0,5M	1,5	1000 mL	~7-8	60°C	170 rpm	10

4.2.1. Caracterização do α -TCP

As características estruturais e morfológicas do pó de cimento de α -TCP sintetizado por precipitação via úmida foram analisadas por meio de análises de Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia Infravermelha (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e granulometria laser.

As fases cristalinas presentes no material foram determinadas qualitativamente com um difratômetro Phillips modelo X'pert MPD com radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5406\text{\AA}$) e filtro de Ni ajustado a 40kV e 40mA. Foi utilizado um intervalo de varredura de 20-40°, com um tamanho de passo de 0,02° e um tempo por passo de 2 segundos. A morfologia das partículas do cimento de α -TCP foi observada através de um microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM 6060. Prévio à análise, foi necessário metalizar a superfície da amostra com uma camada de ouro. Os espectros infravermelhos foram obtidos utilizando o equipamento FTIR Shimadzu IRAfinitty-1 em modo ATR na faixa de número de onda compreendida entre 500 – 4000 cm^{-1} .

Adicionalmente, a distribuição de tamanho de partícula dos cimentos moídos foi determinada por ensaios de granulometria por difração laser num granulômetro comercial

CILAS 1180. O método experimental escolhido foi a úmido, no qual a amostra fica suspensa em um fluido durante as medidas de distribuição de partículas. O meio líquido utilizado foi álcool etílico, com o objetivo de não promover reação de hidratação nas partículas de α -TCP.

4.3. Avaliação das soluções e planejamento do experimento

No presente trabalho foi estudada a influência da composição da fase líquida do sistema na porosidade das amostras de cimento de fosfato de cálcio. Duas variáveis independentes foram estabelecidas: a concentração de um surfactante e a concentração do hidrogenofosfato disódico (Na_2HPO_4) na solução aceleradora. Foram avaliados dois tipos de surfactantes: Lauril Sulfato de Sódio [$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$, *SLS*] e Lutensol® ON 110 [$\text{RO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{11}\text{H}$, *L110*].

O efeito das variáveis independentes foi estudado através de um delineamento composto central (DCC) para cada tipo de surfactante. Este planejamento é composto de 11 combinações experimentais distribuídas da seguinte forma (Fig. 4.3):

- 4 combinações que compõem o experimento fatorial 2^2 , chamados de pontos de vértice. $(\pm 1, \pm 1)$
- 4 pontos axiais, chamados de pontos de estrela, com os quais pode se determinar se existir interação entre as duas variáveis independentes. Estes pontos estão localizados a uma distância $\alpha = \pm\sqrt{2}$ do centro. $(\pm\sqrt{2}, 0)(0, \pm\sqrt{2})$
- 3 pontos centrais para estimar o erro experimental. $(0,0)$

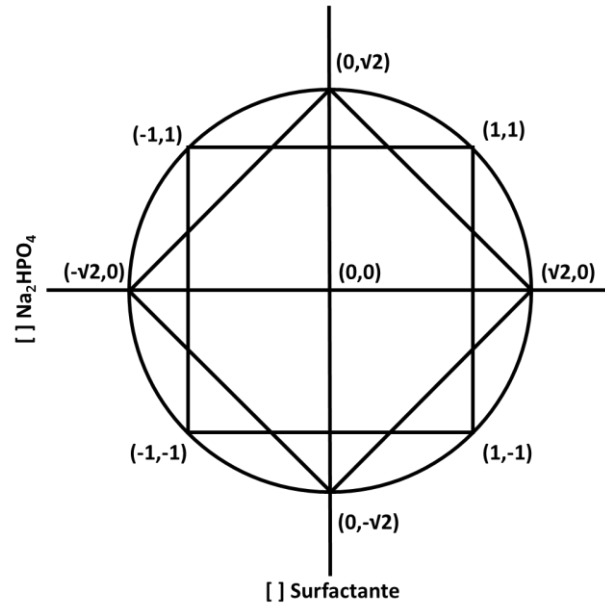


Fig. 4.3. Distribuição experimental do desenho proposto.

Os valores dos níveis das variáveis independentes são apresentadas na Tabela 4.2. As faixas de variação entre o limite superior e inferior ($\pm\sqrt{2}$) foram estimadas, no caso das concentrações dos surfactantes SLS e L110, de acordo com experiências preliminares ao presente trabalho. Por outro lado, a faixa de concentrações do hidrogenofosfato de sódio foi determinada a partir da faixa de valores achados na literatura.

Tabela 4.2. Concentrações das variáveis independentes SLS, L110 e Na_2HPO_4 .

COMPOSTO	NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES (CONCENTRAÇÃO)				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	1	$\sqrt{2}$
SLS	0,9	1,10	3,55	6,00	7,00
L110	0,20	0,90	2,60	4,30	5,00
Na_2HPO_4	2,50	3,60	6,25	8,90	10,00

Mediante a ajuda do software *Statgraphics Centurion XVI* foi possível desenhar o quadro de ensaios do planejamento composto central para cada tipo de surfactante. A Tabela 4.3 apresenta o número total de corridas e a suas combinações experimentais.

Tabela 4.3. Quadro de ensaios do planejamento composto central.

Lauril Sulfato de Sódio			Lutensol® ON 110		
Corrida	[] SLS (wt%)	[] Na ₂ HPO ₄ (wt%)	Corrida	[] L110 (wt%)	[] Na ₂ HPO ₄ (wt%)
S1	3,55	6,25	L1	2,60	6,25
S2	1,10	3,60	L2	0,90	8,90
S3	0,09	6,25	L3	2,60	10,00
S4	6,00	8,90	L4	0,90	3,60
S5	7,00	6,25	L5	5,00	6,25
S6	3,55	6,25	L6	2,60	6,25
S7	6,00	3,60	L7	4,30	8,90
S8	1,10	8,90	L8	2,60	2,50
S9	3,55	2,50	L9	4,30	3,60
S10	3,55	10,00	L10	0,20	6,25
S11	3,55	6,25	L11	2,60	6,25

Os resultados obtidos na espumabilidade da solução e tempo médio de vida da espuma (variáveis de resposta) estão em função das concentrações da fase líquida (variáveis independentes). O anterior permite utilizar um modelo polinomial de segunda ordem para representar os resultados em função das concentrações segundo a equação:

$$Y = A + BX_1 + CX_2 + DX_1^2 + EX_2^2 + FX_1X_2 \quad (4.2)$$

Onde Y representa a variável de resposta, X₁ e X₂ são a concentração de surfactante (SLS ou L110) e hidrogenofosfato de sódio, respectivamente, e A, B, C, D, E e F são as constantes do modelo, as quais foram determinadas, com ajuda do software, mediante uma análise de regressão múltipla dos resultados experimentais, pelo método dos mínimos quadrados. A partir da equação 4.2 obtém-se um gráfico de superfície de resposta, onde é possível analisar mais claramente o grau de sensibilidade da variável de resposta às mudanças das variáveis independentes.

Neste estudo, foi escolhido como intervalo de confiança, o valor de 95%, ou seja, um valor p inferior a 0,05, deduzindo que a variável é estatisticamente significativa

O objetivo do planejamento experimental é avaliar a combinação das diferentes composições do SLS ou do L110 com várias composições do hidrogenofosfato disódico, com a finalidade de posteriormente escolher o surfactante e seis combinações surfactante/hidrogenofosfato que apresentem melhor comportamento na formação de espuma com a metodologia proposta neste trabalho.

4.3.1. Espumabilidade da solução

A espumabilidade das soluções com as composições exibidas na Tabela 4.3 foi avaliada da seguinte forma:

Primeiramente foram coletados 2,2mL (V_i) da solução, de concentração X_1 e X_2 (wt%) de surfactante e hidrogenofosfato disódico, respectivamente, com uma seringa convencional de 10mL. Posteriormente ela foi conectada a outra seringa através de uma válvula de PVC flexível (Figura 4.4a) a fim de deslocar a solução entre as duas, formando uma fase espumada graças à turbulência gerada no líquido. A frequência de empurre dos êmbolos foi fixada em 160 batidas por minuto (2,67 Hz) com a ajuda de um metrônomo digital e o tempo de mistura foi de 30 segundos.

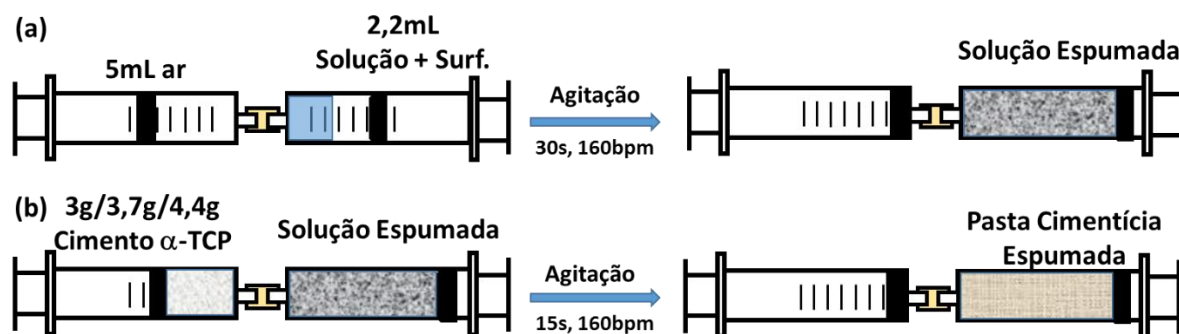


Fig. 4.4. Dispositivo de mistura do sistema Cimento/Líquido. (a) Espumação da solução. (b) Obtenção da pasta cimentícia.

A espuma obtida foi injetada numa proveta graduada de 20mL, onde foi medido o seu volume (V_f). A espumabilidade da solução avaliada foi então determinada como o aumento no volume da solução com concentração X_1 e X_2 de surfactante e hidrogenofosfato de sódio,

respectivamente, ao introduzir ar nela durante a agitação. Logo, a espumabilidade (E) está definida por:

$$E = \left(\frac{V_f - V_i}{V_i} \right) \times 100 \quad (4.3)$$

4.3.2. Estabilidade da Espuma

A estabilidade ou tempo médio de vida da espuma ($S_{1/2}$) foi determinada como o tempo em que 1,1mL do líquido foi segregado por gravidade.

4.4. **Preparação dos cimentos macroporosos de α -TCP**

Após a avaliação das soluções por sua espumabilidade e estabilidade da espuma, as seis melhores combinações surfactante/hidrogenofosfato foram escolhidas para continuar a parte experimental. Assim, a obtenção da pasta cimentícia porosa está composta por 2 etapas:

A primeira é a espumação manual da solução, utilizando a metodologia explicada na *Seção 4.3.1*.

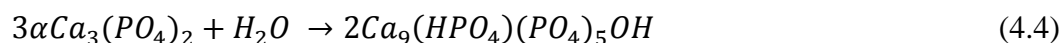
A segunda, depois de espumar a fase líquida, esta foi mantida em sua totalidade numa das seringas para posteriormente adicionar 3g (L/P=0,73mL/g), 3,67g (L/P=0,60mL/g) ou 4,4g (L/P=0,50mL/g) de cimento de α -TCP à seringa vazia. As duas fases foram posteriormente misturadas com uma frequência de empurre dos êmbolos de 160 batidas por minuto e durante 15 segundos (Figura 4.4b). Finalmente, a pasta cimentícia foi injetada em moldes de silicone cilíndricos de 8 mm de diâmetro e 2,7 mm de altura. As amostras foram mantidas no molde durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e a uma umidade relativa de 100%. Posteriormente, os corpos de prova foram desmoldados e imersos em solução de Ringer por um período de tempo de 72h, a uma temperatura de 37°C e com relação volumétrica líquido/sólido de 50mL/cm³. Após a imersão, as amostras foram enxaguadas com acetona para interromper reação de pega e posteriormente caracterizá-las.

4.5. Caracterização estrutural e mecânica dos cimentos

As amostras de espuma de cimento de fosfato de cálcio elaboradas com as relações L/P de 0,73, 0,60mL/g e 0,5mL/g foram caracterizadas com as técnicas apresentadas a seguir.

4.5.1. Difração de Raios X

As amostras obtidas foram caracterizadas estruturalmente por difração de raios X (DRX) para avaliar a influência dos agentes espumantes e da concentração do hidrogenofosfato de sódio na transformação do α -TCP em CDHA, após a imersão em solução de Ringer segundo a reação:



Para isto foram selecionadas as amostras correspondentes aos pontos axiais ($(\pm\sqrt{2},0)$ e $(0,\pm\sqrt{2})$) e centrais $(0,0)$ do planejamento composto central para conferir se o aumento da concentração de surfactante ou fosfato de sódio influencia na transformação de α -TCP para CDHA. As amostras foram previamente moídas em um almofariz e posteriormente peneiradas em malha ABNT 325. Foi utilizado um intervalo de varredura de 20-40°, com um tamanho de passo de 0,02° e um tempo por passo de 2 segundos.

4.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Com o objetivo de analisar as características macro- e microestruturais das amostras de cimento de fosfato de cálcio espumado, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras analisadas sofreram a aplicação de uma camada fina de ouro via Sputtering.

A partir das micrografias MEV das amostras foi calculada a distribuição de diâmetros de poros com a ajuda do software *ImageJ*. Para efetuar a análise foram medidos pelo menos 100 poros por amostra.

4.5.3. Porosidade

A porosidade das amostras foi calculada a partir do método geométrico. Os corpos de prova foram pesados individualmente em uma balança com precisão de $\pm 0,0001\text{g}$ e posteriormente as suas dimensões foram medidas com um paquímetro. A densidade (ρ) das amostras foi calculada pela divisão da massa (m_a) com o volume da amostra (Equação 4.5). Logo, a porosidade dos corpos de prova foi estimada acordo com a fórmula (Equação 4.6). Por último, para o cálculo da macroporosidade (Equação 4.7) foi empregada a densidade da amostra controle ($\rho_{0\%}$), isto é, uma amostra de cimento sem espumar (0% surfactante e 2,5% Na_2HPO_4). Não foram consideradas outras concentrações de hidrogenofosfato de sódio para elaborar as amostras controle, pois não foram observadas diferenças significativas na porosidade de amostras preparadas com maiores concentrações de fosfato.

$$\text{Densidade} = \left(\frac{m_a}{\pi \times r_a^2 \times h_a} \right) \quad (4.5)$$

$$\% \text{Porosidade} = 1 - \left(\frac{\rho}{\rho_0} \right) \times 100 \quad (4.6)$$

$$\% \text{Macroporosidade} = 1 - \left(\frac{\rho}{\rho_{0\%}} \right) \times 100 \quad (4.7)$$

Onde ρ_0 é a densidade do fosfato de cálcio após a reação de pega, a qual foi determinada por picnometria segundo a norma ASTM D854–14 *Specific Gravity of Soil Solids by Water Pycnometer*, utilizando álcool etílico 99,9% como meio líquido. O procedimento foi realizado cinco vezes, utilizando a média dos valores como ρ_0 na equação 4.6.

Foram avaliados 5 corpos de prova por experimento, apresentando como resultado a média dos valores calculados. Uma análise de variância (ANOVA) foi efetuada para analisar os resultados, utilizando o teste *t-Student* para comparar as médias dos valores calculados. As diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas para valores $p < 0,05$.

4.5.4. Resistência à Compressão

Para avaliar a resistência mecânica à compressão das amostras, a pasta cimentícia foi injetada e conformada em um molde segundo a norma ASTM F451-95 *Standard Specification for Acrylic Bone Cement*, isto é, um molde de aço inoxidável com cavidades de $6\text{mm} \pm 0,1\text{mm}$ de diâmetro e $12\text{mm} \pm 0,1\text{mm}$ de altura. Antes da injeção da pasta cimentícia, as cavidades do molde foram lubrificadas manualmente com uma fina camada de vaselina para facilitar a desmoldagem dos corpos de prova.

As amostras foram mantidas no molde durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e a uma umidade relativa de 100%. Posteriormente, o molde com as amostras foi imerso em solução de Ringer por um período de tempo de 72h, a uma temperatura de 37°C . Após a imersão, os corpos de prova foram desmoldados e submetidos a uma análise visual direta, com o intuito de verificar a integridade e acabamento superficial. Assim, foram descartadas as amostras que apresentaram defeitos visíveis como fissuras, trincas ou falta de preenchimento.

O teste de compressão foi realizado no equipamento de ensaio mecânico universal INSTRON modelo 3369, com uma velocidade da travessa de $1\text{mm}/\text{min}$ e uma célula de carga de 2KN. A resistência mecânica à compressão é dada pela tensão de ruptura última do corpo de prova, a qual depende da força atuante na área transversal. A resistência mecânica à compressão foi calculada de acordo com a equação 4.8:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (4.8)$$

Onde σ é a tensão de ruptura (MPa), F é a força (N) necessária para a fratura e A (mm^2) é a área transversal do corpo de prova. Foram ensaiadas 6 amostras por cada concentração de surfactante/hidrogenofosfato e relação L/P. Foi efetuada uma análise ANOVA, utilizando o teste *t-Student* para comparar as médias dos valores calculados. As diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas para valores $p < 0,05$.

4.6. Caracterização *In Vitro*

4.6.1. Preparação do Fluido Corporeo Simulado (SBF)

O fluido corporal simulado (SBF) foi elaborado segundo o protocolo descrito por Kokubo e Takadama (Kokubo e Takadama, 2006). Foi preparado o SBF corrigido (c-SBF), cujas concentrações de íons diferem ligeiramente das do plasma sanguíneo. A composição iônica do SBF e do plasma sanguíneo está descrita a seguir na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Concentração iônica do SBF e do Plasma Sanguíneo.

	CONCENTRAÇÃO DE ÍONS (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁺	SO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

4.6.2. Imersão das amostras em SBF

Os corpos de prova (8x2,7mm) foram imersos em fluido corporal simulado (SBF) por quatro diferentes períodos de tempo; 1, 3, 7 e 21 dias, à temperatura de 37°C e empregando uma relação volume do SBF/área cimento igual a 0,1mL/mm². Foram utilizados recipientes de plástico para a imersão das amostras, onde a solução foi trocada cada 2 dias. Após o tempo de imersão, as amostras foram lavadas com acetona para parar a reação e seca em estufa.

4.6.2.1. *Teste de degradação e bioatividade*

Para o teste de degradação, os discos foram previamente secos e pesados em uma balança de precisão ± 0,001g antes e após a imersão em SBF. A perda de massa (W_L) foi calculada de acordo com a equação 4.9:

$$W_L = \left(\frac{W_0 - W_d}{W_0} \right) \times 100 \quad (4.9)$$

Onde W_0 é a massa inicial da amostra e W_d a massa da amostra seca após o tempo de imersão (1, 3, 7 e 21 dias). Cada medida foi realizada em triplicata e o valor médio foi calculado.

A bioatividade das amostras foi avaliada, analisando a superfície dos cimentos segundo a norma ISO 23317, com a ajuda do microscópio eletrônico de varredura JEOL 6060. As amostras foram previamente recobertas com uma camada de ouro na sua superfície.

5. ANÁLISE DE RESULTADOS

5.1. Caracterização do α -TCP

5.1.1. Difração de Raios X

A Figura 5.1 apresenta os difratogramas correspondentes aos fosfatos de cálcio obtidos pela metodologia descrita na *Seção 4.2* antes (a) e depois (b) da calcinação. A fase presente em (a) é Hidroxiapatita (JCPDS 9-432), a qual exibe baixa cristalinidade uma vez que são evidenciados picos de baixa intensidade; a sobreposição dos picos principais também foi observada. Por outro lado, os picos em (b) correspondem ao α -TCP (JCPDS 9-348) como fase única detectada por esta técnica. Não foram evidenciados picos atribuídos à presença de fases indesejáveis como β -TCP (JCPDS 9-169) ou HA. No entanto, o valor mínimo do limite de detecção de fases do aparelho de difração de raios X utilizado é de 4%, por esta razão não pode se afirmar que foi obtida um fosfato de cálcio composto por um 100% de α -TCP. Contudo, o α -TCP é considerado a fase majoritária obtida após a calcinação a 1400°C do CDHA, obtido por via úmida.

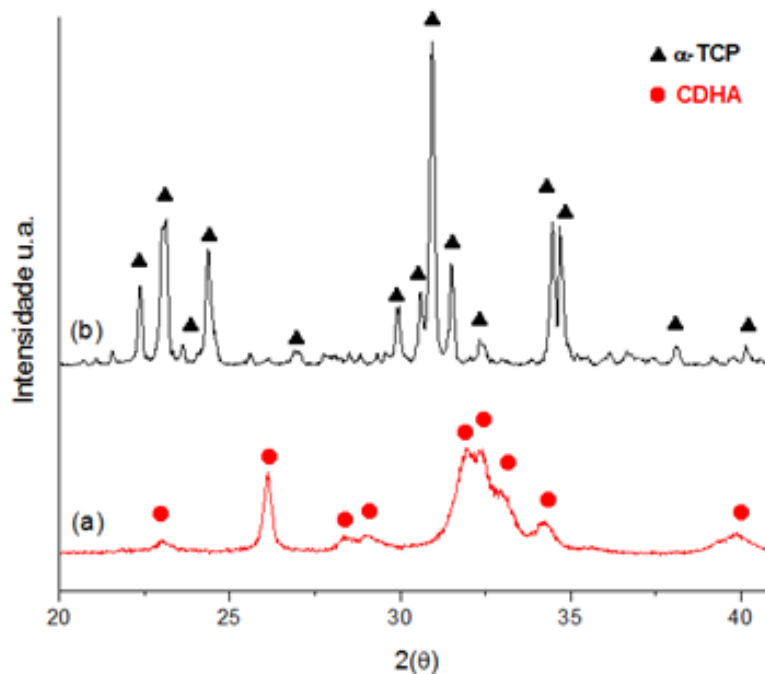
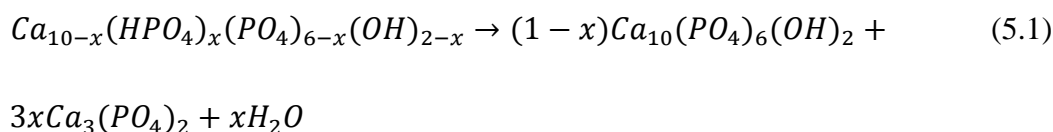


Fig. 5.1. Difratogramas de raios X dos fosfatos de cálcio obtidos por via úmida. (a) Antes e (b) depois da calcinação a 1400°C por uma hora.

A baixa cristalinidade da Hidroxiapatita obtida é característica dos processos de precipitação em ausência de elevadas temperaturas. Este resultado concorda com o reportado por Raynaud e colaboradores (Raynaud *et al.*, 2002), os quais obtiveram uma única fase de CDHA de baixa cristalinidade ao misturar $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e $(\text{NH}_4)_2(\text{HPO}_4)_4$ com uma proporção Ca/P igual a 1,535. Para valores inferiores a 1,5, os autores reportaram a presença de Monetita (CaHPO_4); o aumento da proporção iônica de cálcio e fósforo tendeu em um aumento da cristalinidade do precipitado. Além disso, o processo de decomposição da CDHA em α -TCP foi descrito por Safranova e colaboradores (Safranova *et al.*, 2011) como um processo constituído por várias etapas dependentes da temperatura, isto é, remoção da água adsorvida (20-100°C); decomposição do nitrato de amônio (50-220°C); compensação da deficiência em cálcio por substituições dos grupos $(\text{HPO}_4)^{2-}$ por $(\text{PO}_4)^{3-}$ (650-850°C); e desidratação do composto (>800°C). A decomposição do CDHA ocorre de acordo à seguinte equação de reação:



Assim, quanto maior for a deficiência em cálcio da CDHA, isto é, a relação Ca/P tende para 1,5, maior a perda de massa por eliminação de água (Valletregi, 1997) e como resultado, a formação de α -TCP é favorecida (>1150°C) como única fase após o tratamento térmico.

5.1.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A Figura 5.2 mostra o resultado da espectroscopia de infravermelho para o α -TCP sintetizado. Podem-se observar 2 bandas largas contidas entre comprimentos de onda 531 – 605 cm^{-1} e 944 – 1076 cm^{-1} . A primeira banda é a correspondente ao modo de vibração antissimétrico de flexão (ν_4) referente aos grupos PO_4 . As bandas em 551, 566 e 595 cm^{-1} estão sobrepostas, aumentando a largura da banda. A segunda, composta pela sobreposição das bandas contidas em 944, 988, 1032 e 1055 cm^{-1} , corresponde ao modo de vibração

antissimétrico de deformação (ν_3) dos grupos PO_4 (Carrodegas e De Aza, 2011). Não foram evidenciados picos ou bandas pertencentes nem a grupos OH nem a água adsorvida.

Tanto a difração de raios X, quanto a espectroscopia infravermelha revelaram que o α -TCP é a fase majoritária, o qual avalia positivamente a metodologia utilizada para sintetizar este fosfato de cálcio como material para ser utilizado como cimento.

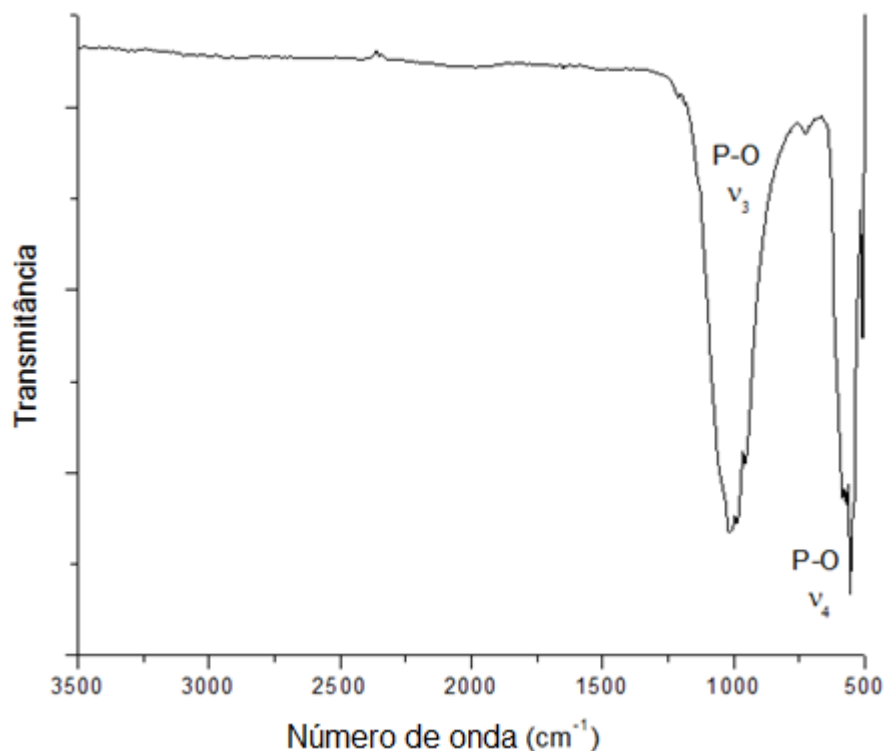


Fig. 5.2. Espectro FTIR do α -TCP sintetizado por via úmida.

5.1.3. Granulometria a Laser e Microscopia Eletrônica de Varredura

Nem só a composição do pó, mas também as características morfológicas das partículas são de grande importância na hora de estudar a reação cimentante do composto. A distribuição do tamanho de partícula do pó de α -TCP depois da moagem manual e o peneiramento é apresentada na Figura 5.3.

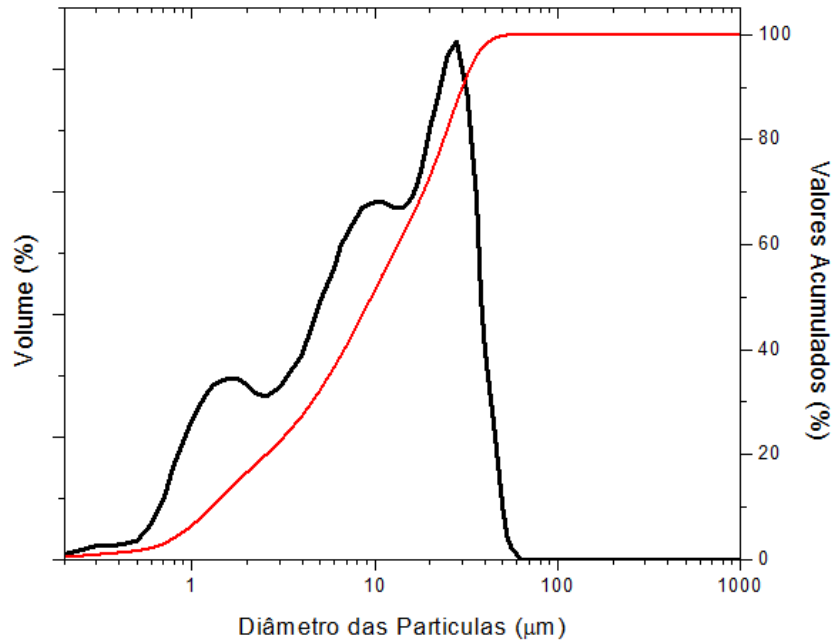


Fig. 5.3. Análise granulométrica do α -TCP após moagem e peneiramento através da malha #325.

O pó de α -TCP apresentou uma distribuição trimodal assimétrica crescente de tamanhos de partícula. O tamanho médio de partícula (d_m) foi de $13,12\mu\text{m}$; d_{10} : $1,29\mu\text{m}$; d_{50} : $9,57\mu\text{m}$; e d_{90} : $30,13\mu\text{m}$. Estes valores estão acima dos reportados como adequados na literatura, que sugerem tamanhos médios de partícula inferiores a $10\mu\text{m}$, com a finalidade de otimizar (diminuir) a relação líquido/pó (L/P) do cimento. Já que a metodologia proposta neste trabalho para a obtenção de uma pasta cimentícia espumada requer uma baixa viscosidade da mesma, ou seja, uma elevada razão L/P, utilizou-se o α -TCP com a distribuição de tamanhos de partícula apresentada na Fig. 5.3 como pó cimentante. Do mesmo modo, na Figura 5.4 é apresentada a micrografia de microscopia eletrônica de varredura correspondente ao pó de α -TCP peneirado em malha ABNT 325. Os resultados obtidos para a distribuição de tamanhos de partícula foram evidenciados na micrografia. É evidente a presença de partículas maiores de geometria poliédrica e irregular com tamanhos iguais ou maiores a $20\mu\text{m}$, além de particulados muito mais finos. Isto confirma a ampla faixa de diâmetros de partícula obtido por granulometria a laser.

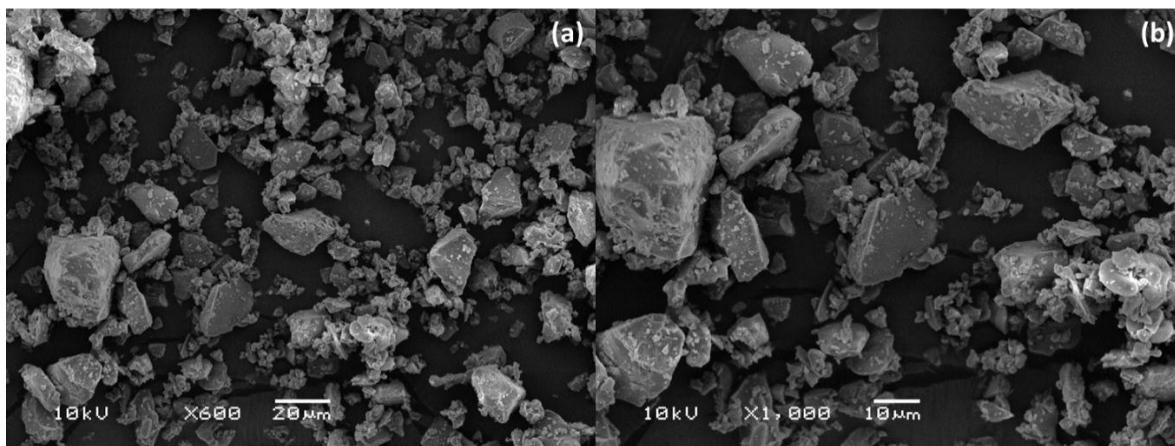


Fig. 5.4. Microscopia MEV do pó de α -TCP moído e peneirado. (a) 600x e (b) 1000x.

Além disso, nas distribuições de tamanhos polimodais, como a obtida na Fig. 5.3, tende a ser mais eficiente o empacotamento das partículas (Funk e Dinger, 1994), já que os vazios gerados pelas partículas mais grossas são preenchidos pelas partículas médias e finas. Como resultado, a densidade total do cimento aumenta devido a uma diminuição da microporosidade do material. O anterior não afetará a obtenção de amostras de cimento macroporosas, uma vez que ela será gerada no cimento ao introduzir ar na pasta.

5.2. Avaliação das soluções

As soluções contendo diferentes concentrações de Na_2HPO_4 e Lauril Sulfato de Sódio ou Lutensol® ON 110 (Tabela 4.3) foram caracterizadas segundo a espumabilidade e estabilidade das mesmas.

5.2.1. Espumabilidade

A Figura 5.5 apresenta as superfícies de resposta para a espumabilidade em função das concentrações de surfactante e fosfato de sódio das soluções avaliadas.

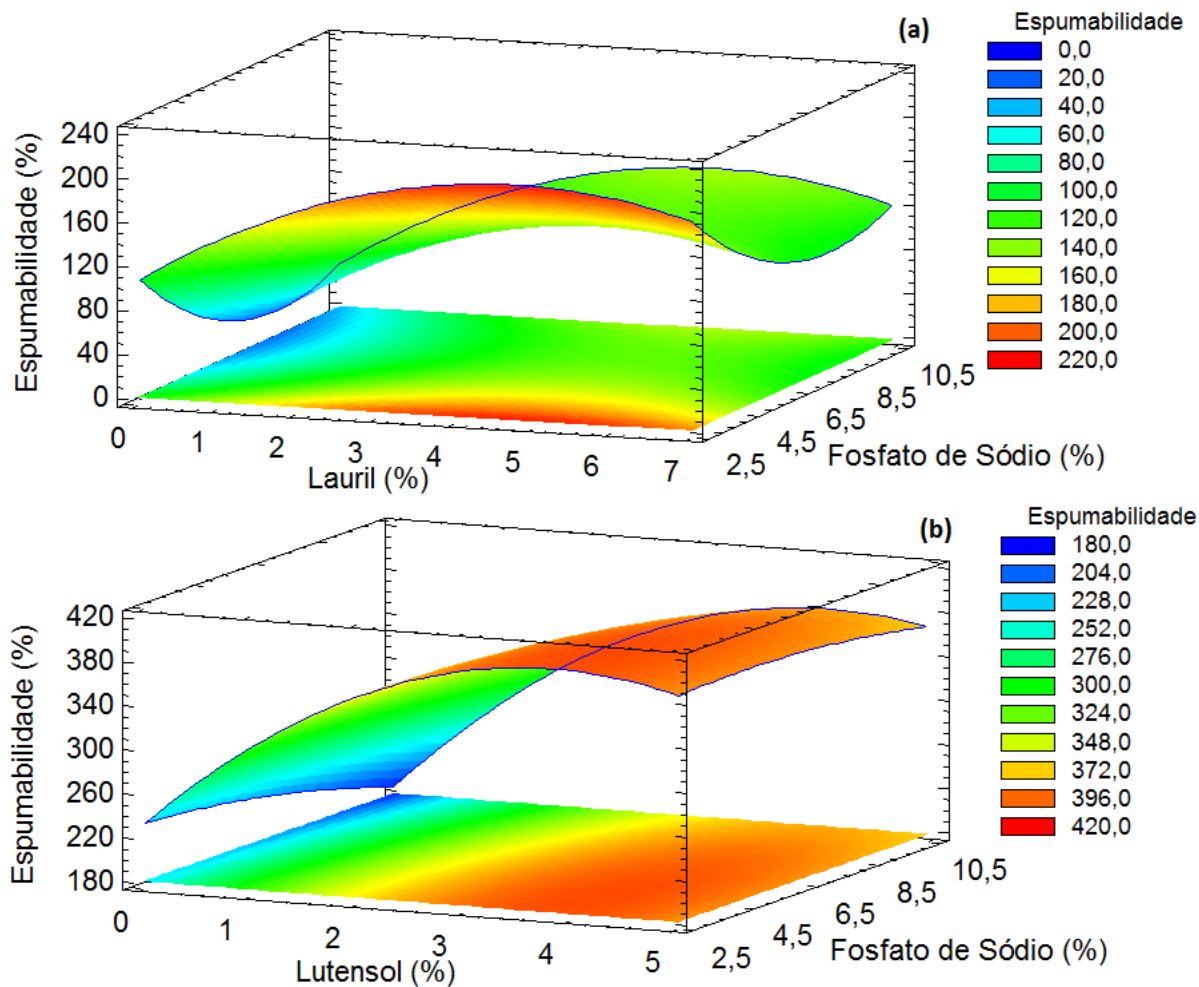


Fig. 5.5. Superfícies de resposta para a espumabilidade das soluções com (a) SLS e (b) L110.

Os valores de R^2 ajustado calculados para as superfícies correspondentes às soluções com SLS e L110 foram 0,9324 e 0,9375, respectivamente. Estes valores representam a porcentagem de variação da variável de resposta (espumabilidade) em função das variáveis independentes. Quer dizer que as superfícies de resposta apresentadas na Fig. 5.5 explicam o 93,24% (SLS) e o 93,75% (L110) da variação da espumabilidade em função das concentrações de fosfato e surfactante. Como era de esperar, em ambos casos a concentração de surfactante foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na hora de avaliar a espumabilidade da solução. O valores p calculados tanto para o SLS quanto para o L110 foram iguais a 0,0013 e 0,0001, respectivamente. Além disso, é evidente nas duas superfícies que com o aumento

da concentração de surfactante a espumabilidade aumenta até atingir um valor máximo, que depois, com um maior aumento dessa concentração, não varia significativamente. Este fenômeno é atribuído ao alcance da concentração micelar crítica (CMC) do surfactante na solução. Após alcançar este valor, a espumabilidade da solução não aumentará mais e tenderá a permanecer constante (Porter, 1993; Schramm, 2005). Por outro lado, a concentração de Na_2HPO_4 foi também estatisticamente significativa na espumabilidade no caso das soluções com SLS ($p=0,0018$). É claro que com o aumento do sal de fosfato na solução, a sua espumabilidade tende a diminuir. Pelo contrário, a adição de Na_2HPO_4 não influenciou significativamente a espumabilidade das soluções com L110 ($p=0,1096$). Isto pode ser explicado pela interação do eletrólito com as micelas dos surfactantes. Os surfactantes aniônicos (SLS) são mais propensos do que os não-iônicos (L110) a sofrer repulsões elétricas entre as cabeças polares da suas moléculas anfipáticas, causando, por exemplo, uma redução da CMC (Lyon, 2002).

Analisando e comparando os valores da espumabilidade das soluções com SLS e L110, pode se concluir que as soluções que utilizarem Lutensol ON 110 apresentaram um aumento muito maior do seu volume (%) depois da agitação do que as soluções com Lauril Sulfato de Sódio. O menor e maior valor de espumabilidade corresponderam às corridas L2 (286,4%) e L9 (400%), respectivamente. Analogamente, o menor e maior valor da variável de resposta para as soluções com SLS foi de 45,5% (S3) e 209,1% (S9), respectivamente. Em outras palavras, o maior valor de espumabilidade nas corridas com SLS foi menor do que o menor valor nas corridas com L110. Estes resultados são aplicáveis apenas para a metodologia de espumação utilizada neste estudo. Os resultados de espumabilidade podem variar dependendo principalmente da quantidade de ar introduzido na solução e do método de agitação. Uma das vantagens da espumação com seringas é o controle do volume de ar introduzido na suspensão, o qual pode ser difícil de conseguir utilizando uma batedeira ou um agitador mecânico. Como resultado, a reprodutibilidade da espumação nas seringas pode ser muito maior do que a espumação obtida por outros métodos. Contudo, a velocidade e força de agitação alcançada pela metodologia manual é com certeza menor do que as obtidas por métodos mecânicos. Assim, o volume final de espuma pode ser muito maior se são

utilizadas bateadeiras ou agitadores mecânicos, como reportaram Montufar e colaboradores (Montufar E.B. *et al.*, 2010) e Unosson e colaboradores (Unosson *et al.*, 2015).

A análise de otimização do processo efetuada pelo software *Statgraphics* para a espumabilidade das soluções com L110 concluiu que para obter o maior aumento de volume, as concentrações de Na_2HPO_4 e L110 devem ser 3,78 e 3,87wt%, respectivamente. No entanto, é importante esclarecer que a porosidade final das amostras de cimento pode não ser função exclusiva do volume final da espuma. Tanto a estabilidade da espuma, quanto o tempo de pega do cimento também poderiam influenciar o grau de porosidade final do corpo de prova.

Este resultado confirma a preferência de L110 sobre o SLS para continuar o presente estudo.

5.2.2. Estabilidade

A superfície de resposta da estabilidade da solução em função das concentrações de fosfato e L110 é exibida na Figura 5.6.

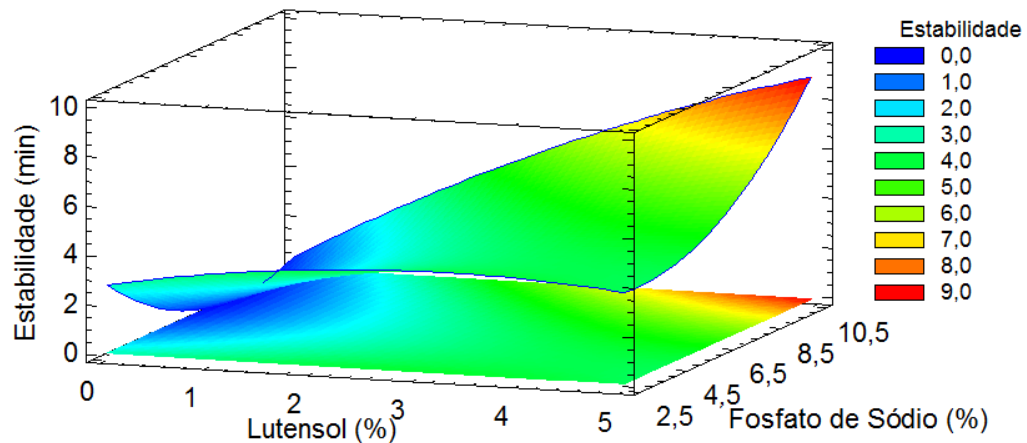


Fig. 5.6. Superfície de resposta para a estabilidade das soluções com Na_2HPO_4 e L110.

Segundo o valor do R^2 ajustado calculado, a superfície de resposta representa o 96,02% da variação da estabilidade da solução em função das concentrações de fosfato e L110. Para baixos teores de Na_2HPO_4 , o surfactante não influencia de forma significativa a estabilidade da espuma. No entanto, o valor p referente ao surfactante é igual a 0,0001, isto é, a concentração de surfactante é estatisticamente significativa na variação da estabilidade.

A influência do L110 é evidenciada para maiores teores de fosfato de sódio, onde a espuma retém a sua estrutura por maior tempo com o aumento da quantidade de Lutensol. Por outro lado, o aumento da concentração de fosfato de sódio também influencia significativamente a variável de resposta ($p=0,0146$). Com o incremento do teor de Na_2HPO_4 o tempo de estabilidade aumenta significativamente. Como resultado, diferentemente da espumabilidade, a estabilidade depende tanto da ação individual das variáveis independentes, quanto da interação entre elas ($p=0,0035$). Isto sugere que o L110 interage com o fosfato sem afetar a espumabilidade mas afetando o tempo de vida médio da solução espumada.

De acordo com os resultados de espumabilidade e estabilidade das soluções com concentrações de Lutensol® ON 110, foram selecionadas as 6 composições, que apresentaram a maior espumabilidade e estabilidade na avaliação, para elaborar as amostras de cimento macroporoso. A Tabela 5.1 apresenta as composições com seus valores obtidos para os testes de espumabilidade e estabilidade.

Tabela 5.1. Composições das soluções selecionadas para elaborar as amostras de cimento.

Corrida	Lutensol (wt%)	Na_2HPO_4 (wt%)	Espumabilidade (%)	Estabilidade (min)
L3	2,6	10,0	354,5	5,34
L5	5,0	6,25	390,9	4,33
L6	2,6	6,25	377,3	3,23
L7	4,3	8,90	381,8	6,45
L8	2,6	2,50	372,7	4,00
L9	4,3	3,60	400	4,00

5.3. Preparação dos corpos de prova

As amostras de cimento espumado de α -TCP foram elaboradas segundo a *Seção 4.4*. Três diferentes relações líquido/pó (0,73, 0,60 e 0,50mL/g) foram utilizadas para a mistura das fases. Após a obtenção da pasta cimentícia, esta foi injetada em moldes de 8x2,7mm e 6x12mm (Fig. 5.7).

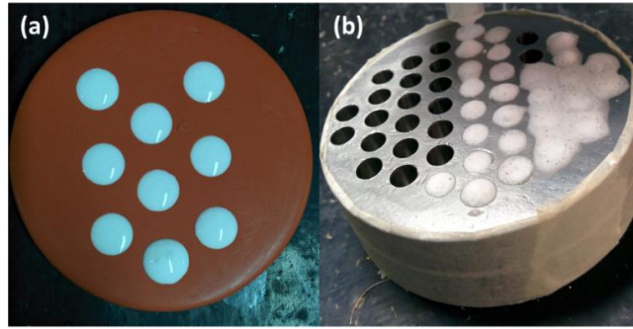


Fig. 5.7. Moldes para a elaboração das amostras. (a) 8x2,7mm e (b) 6x12mm.

Antes de prosseguir com a apresentação dos resultados de caracterização das amostras, é necessário fazer algumas observações ao respeito da mistura e obtenção da pasta cimentícia. Primeiramente, não foi possível obter uma pasta injetável empregando a relação L/P de 0,50ml/g. A quantidade de líquido não foi suficiente para obter uma pasta com a viscosidade necessária para que atravessasse o bico das seringas. Como resultado, a força requerida para a extrusão da pasta através da seringa aumentou consideravelmente, dificultando assim a mistura homogênea das fases. Foi evidenciada a segregação do líquido fora da fase sólida como consequência da elevada viscosidade e baixa fluidez da pasta (Figura 5.8a). Por esta razão, não foi possível elaborar as amostras de 0,50ml/g. Não foi observado esse problema quando foram utilizadas as relações de 0,73 e 0,60ml/g.

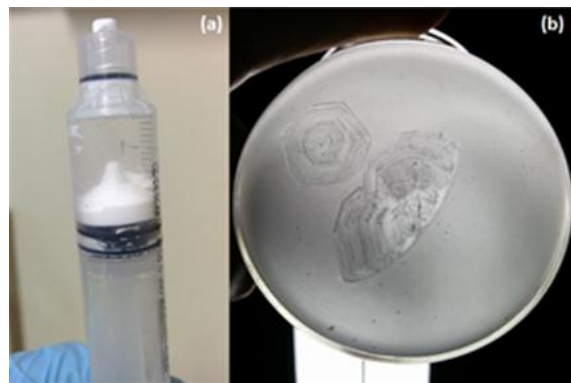


Fig. 5.8. Problemas observados na elaboração das amostras de cimento pelo método proposto. (a) Cimento não injetado após a segregação do líquido. (b) Cristais precipitados na solução L3 depois de 1 mês de ser preparada.

Por outra parte, foi verificada a precipitação de cristais nas soluções com maior concentração de Na_2HPO_4 , ou seja, L3 (10,0wt%) e L7 (8,90wt%) após duas semanas de serem preparadas. A solubilidade do fosfato de sódio em água é aproximadamente 0,218g/mL (Labsynth, 2016), isto é, 21,8g por 100mL. As quantidades de Na_2HPO_4 utilizadas na preparação das soluções L3 e L7 foram 10g e 8,90g por 100mL de água, respectivamente. Ou seja, os teores dissolvidos foram menores do que o limite máximo de solubilidade. No entanto, após dissolver o surfactante na solução aquosa de Na_2HPO_4 , a solubilidade do sal na água diminuiu. Por esta razão, foram evidenciados cristais precipitados nas soluções com maior concentração de fosfato de sódio. Este fenômeno não foi evidenciado para as soluções com 2,50, 3,60 e 6,25wt% de Na_2HPO_4 .

5.4. Caracterização das amostras

Segundo o explicado na seção anterior, as amostras de cimento foram preparadas com razões líquido/pó iguais a 0,73 e 0,60mL/g e com as soluções apresentadas na Tabela 5.1. As amostras serão identificadas a partir daqui com o valor da razão L/P seguida da corrida. Por exemplo, a amostra fabricada com L/P=0,73mL/g e com a solução L8, será identificada como 73-L8. Da mesma forma, a amostra elaborada com a solução L8 e L/P=0,60mL/g seria 60-L8.

5.4.1. Difração de Raios X

Os difratogramas correspondentes às amostras de cimento elaboradas com as soluções L1, L3, L5, L8 e L10 e L/P=0,73mL/g são apresentados na Figura 5.9.

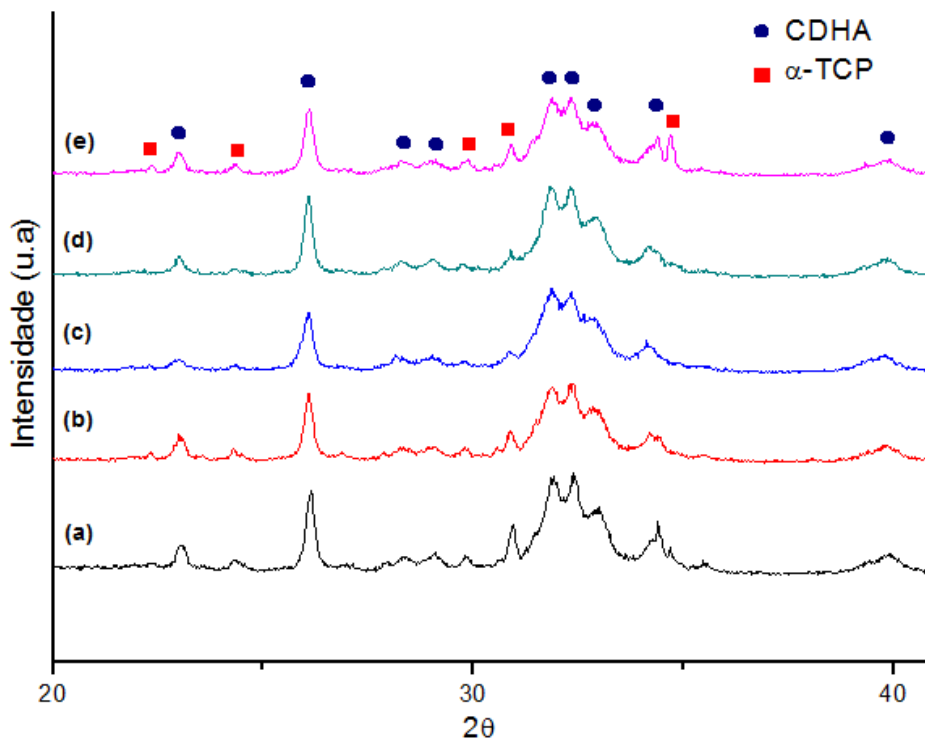


Fig. 5.9. Difração de raios X das amostras de cimento (a) L1, (b) L3, (c) L5, (d) L8 e (e) L10

É evidente a transformação do α -TCP em CDHA após o tempo de imersão em solução de Ringer. No entanto, foram encontrados picos de baixa intensidade pertencentes ao pó cimentante, indicando uma transformação incompleta depois de 3 dias em solução. Ginebra e colaboradores (Ginebra *et al.*, 1997) avaliaram a reação de pega de um cimento apatítico misturado com uma solução aquosa de Na_2HPO_4 (2,5wt%) e reportaram o desaparecimento completo dos picos de α -TCP após 15 dias de imersão em solução de Ringer. Por outro lado, Durucan e Brown (Durucan e Brown, 2002) concluíram que a reatividade do α -TCP diminuiu com a redução da área superficial do pó. O elevado tamanho de partícula usado neste estudo, diminuiu a área superficial do material cimentante, o que pode ter produzido uma redução na cinética de formação de CDHA.

Não foi possível encontrar alguma tendência que relacione o aumento ou diminuição dos teores de Na_2HPO_4 ou de Lutensol® ON 110 com a conversão de α -TCP em CDHA. Picos de maior intensidade, que podem estar dentro do erro do difratômetro, correspondentes ao fosfato tricálcico, foram evidenciados nas amostras preparadas com as soluções L1, L3 e

L10, as quais contêm 2,60wt% L110 – 6,25wt% Fosfato, 2,60wt% L110 – 10,0wt% Fosfato e 0,20wt% L110 – 6,25wt% Fosfato, respectivamente.

5.4.2. Porosidade e Microscopia Eletrônica de Varredura

A Tabela 5.2 exibe os valores correspondentes às densidades, porosidades e macroporosidades calculadas para as amostras de cimento elaboradas com as soluções estudadas para a razão L/P=0,73mL/g. Como referência, foi calculada a porosidade de uma amostra de cimento de controle (C), isto é, sem a adição de surfactante na fase líquida e com uma concentração de Na₂HPO₄ igual a 2,5wt%.

Tabela 5.2. Densidade aparente, Porosidade total e Macroporosidade das amostras de cimento espumado fabricadas com uma razão L/P=0,73mL/g. Os valores estão acompanhados do desvio padrão entre parêntesis.

	Densidade Aparente (g/cm³)	Porosidade Total (%)	Macroporosidade (%)
C - 0,73	1,271 (0,038)	59,71 (1,20)	-
73-L3	0,620 (0,056)	80,36 (1,76)	51,20 (4,95)
73-L5	0,351 (0,023)	88,88 (0,73)	72,36 (2,39)
73-L6	0,593 (0,038)	81,22 (1,19)	53,34 (3,20)
73-L7	0,434 (0,020)	86,26 (0,62)	65,87 (1,97)
73-L8	0,386 (0,027)	87,77 (0,86)	69,63 (2,17)
73-L9	0,269 (0,013)	91,47 (0,41)	78,81 (0,89)

A diminuição da densidade aparente das amostras preparadas com surfactante, em contraste com a das amostras controle, é notável. Como era de se esperar, a introdução e estabilização de ar na pasta cimentícia, graças à ação do surfactante, reduziu significativamente a densidade das amostras. As amostras com menor densidade foram as elaboradas com as soluções L5 e L9, as quais contêm o maior teor de Lutensol: 5 e 4,30wt%, respectivamente. Analogamente, foram as soluções que exibiram a maior espumabilidade na avaliação da *Seção 5.2.1*. Da mesma forma, as amostras fabricadas com a solução L3, que

mostrou a menor espumabilidade das 6 soluções selecionadas, exibiram a maior densidade aparente do grupo. Por outro lado, os valores calculados para a porosidade total e a macroporosidade foram análogos às densidades aparentes. As amostras com maior e menor grau de porosidade foram as confeccionadas com L9 e L3, respectivamente. As porosidades dos cimentos espumados fabricados neste estudo superam o 80% para todas as composições avaliadas. Estes valores superam os valores reportados por Montufar e colaboradores (Montufar *et al.*, 2010; Montufar *et al.*, 2011). Os autores utilizaram Tween 80, um surfactante não iônico, em concentrações de 1 e 5wt%. É importante mencionar que os autores utilizaram razões L/P inferiores a 0,65mL/g, o qual poderia diminuir a porosidade total do cimento ao diminuir o tempo de pega. Por outro lado, Volkmer e colaboradores (Volkmer e Santos, 2007) obtiveram porosidades acima do 80% para amostras de Hidroxiapatita pelo método *Gelcasting*. O surfactante utilizado nesse estudo foi também Lutensol® ON 110. Os autores utilizaram 1% em peso de surfactante para a formação da espuma e reportaram que a espumação da suspensão foi realizada em agitador mecânico, obtendo como resultado amostras macroporosas e altamente interconectadas.

Por outro lado, na Figura 5.10 são apresentadas as micrografias correspondentes às amostras C-0,73 a 11x (a), C-0,73 a 550x (b) e 73-L9 a 50000x (c).

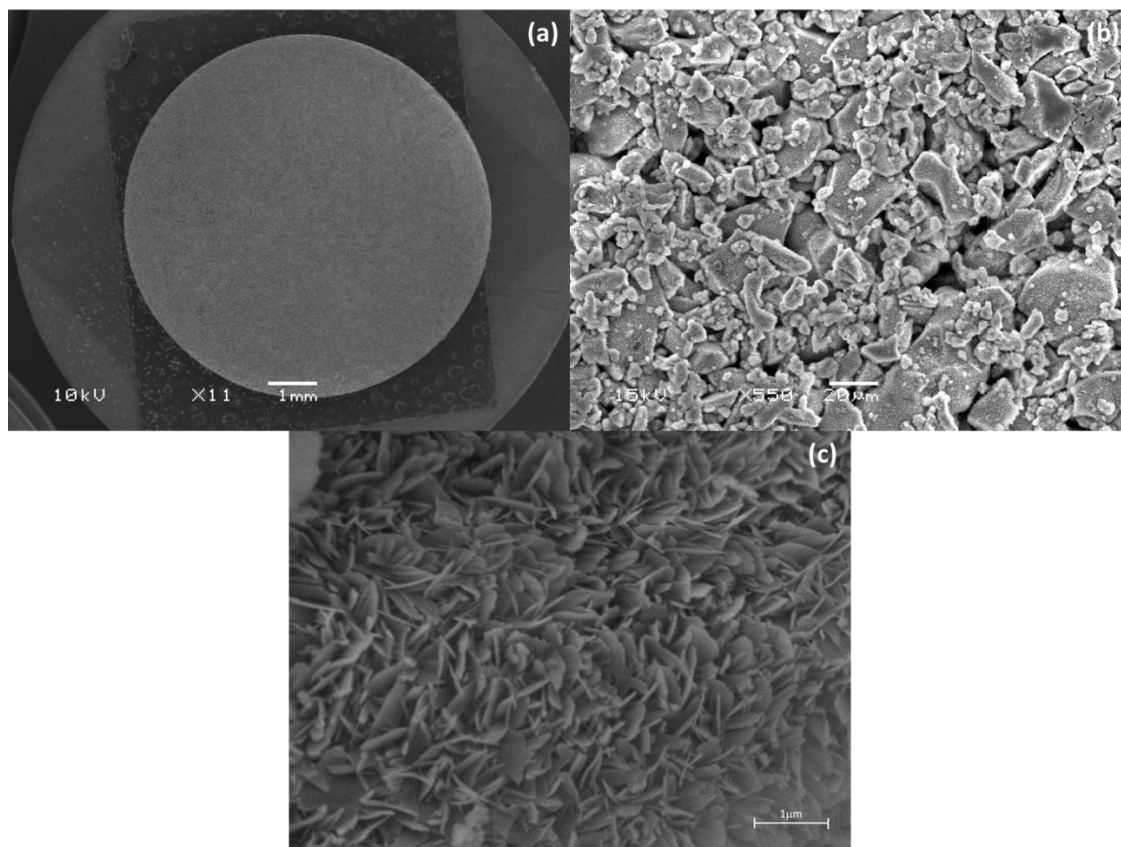


Fig. 5.10. Micrografias MEV para a amostra C-0,73 a (a) Seção transversal, (b) Superfície a maiores aumentos, e para a amostra 73-L9 (c) microestrutura.

Não foi evidenciada a presença de macroporos na amostra elaborada sem L110 na fase líquida. Embora o cimento controle ter sido também misturado manualmente em seringas e possivelmente foram produzidas bolhas na pasta, a ausência de um agente estabilizador impediu a retenção do ar dentro do material. Ainda mais, a porosidade calculada para as amostras controle foi de $59,71 \pm 1,20\%$, ou seja, a porosidade intrínseca do cimento controle é elevada. Isto é consequência tanto do tamanho de partícula utilizado no pó de cimento, quanto da razão L/P usada. Como foi explicado na *Seção 5.1.3*, a distribuição de tamanho das partículas favoreceram o empacotamento do pó de cimento; no entanto, o diâmetro médio de partícula usado foi maior ao reportado como ideal na literatura. Um maior tamanho do particulado, diminui a área de contato do pó, produzindo maiores espaços entre partículas. Isto pode ser observado na Figura 5.10(b), onde foram evidenciados espaços entre as partículas reagidas do cimento. A hidrólise do α -TCP está limitada pela área superficial

do pó cimentante em contato com o líquido, formando a camada superficial de CDHA ao redor das partículas do pó inicial. Por esta razão, a geometria das partículas de α -TCP são mantidas após a reação de pega. Por outro lado, os cristais de CDHA precipitados a partir de partículas maiores de α -TCP apresentam uma morfologia petaloide, os quais elevam a porosidade por consequência das lacunas entre eles (Ginebra *et al.*, 2012). A Figura 5.10(c) mostra a microestrutura do cimento 73-L9 após a imersão em solução de Ringer, a qual, como era de esperar, está composta de cristais petaloides de CDHA. Não foram evidenciadas diferenças na microestrutura dos cristais, observada por MEV, dos outros corpos de prova. Por outro lado, a elevada razão L/P utilizada, em contraste com a reportada na literatura como ideal para aplicações médicas (L/P=0,32mL/g) (Ginebra *et al.*, 1994), favorece também o aumento da porosidade intrínseca do cimento ao aumentar a distância entre as partículas cimentantes (Ginebra *et al.*, 2012). Almirall e colaboradores (Almirall *et al.*, 2004) espumaram um cimento de α -TCP com uma solução de H₂O₂, variando os tamanhos de partícula do pó e as razões L/P. Os autores concluíram que as duas variáveis influenciaram significativamente a porosidade intrínseca dos cimentos, pelas razões previamente explicadas.

As micrografias MEV para as amostras espumadas de cimento de α -TCP fabricadas com L/P=0,73mL/g são mostradas na Figura 5.11.

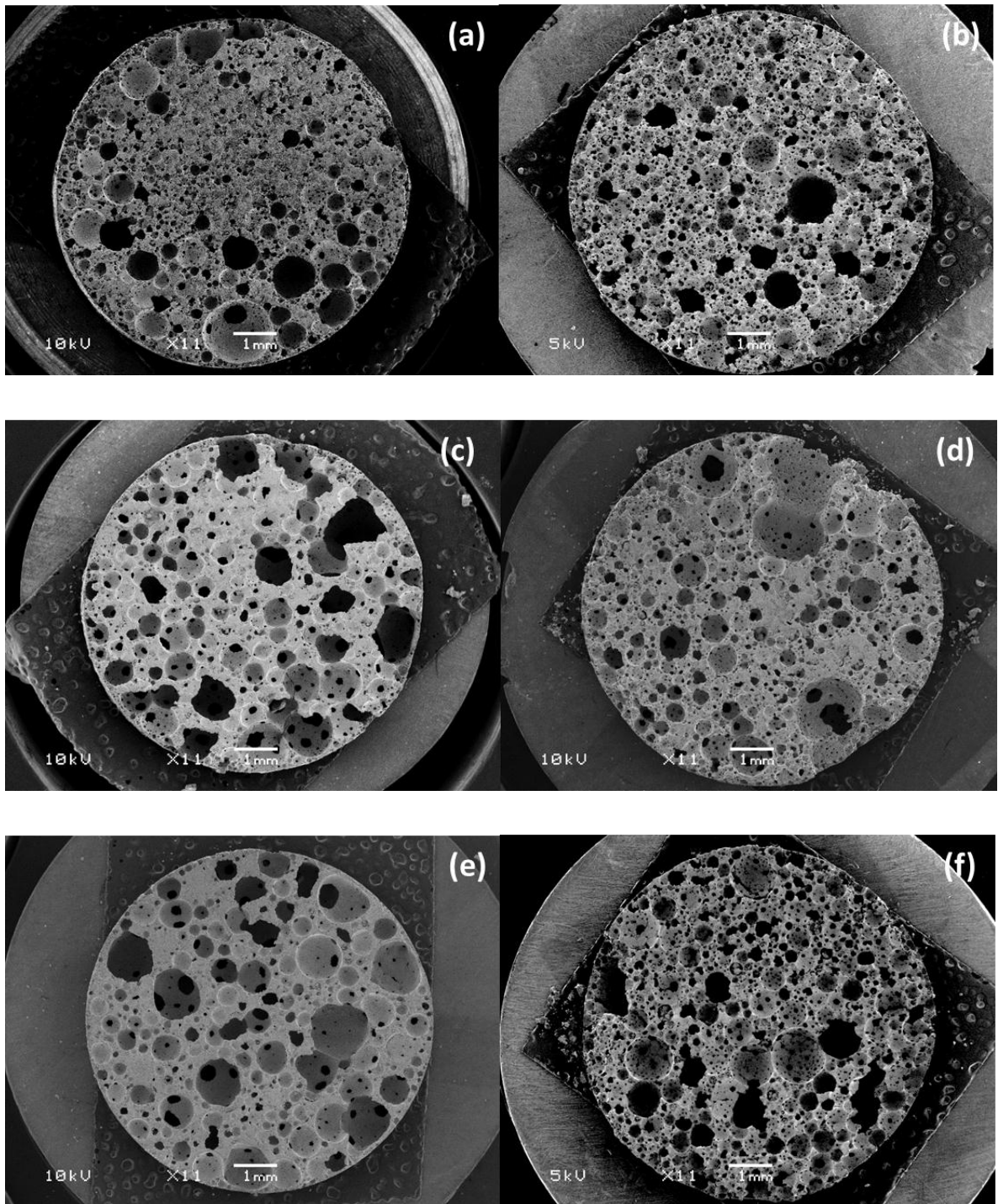
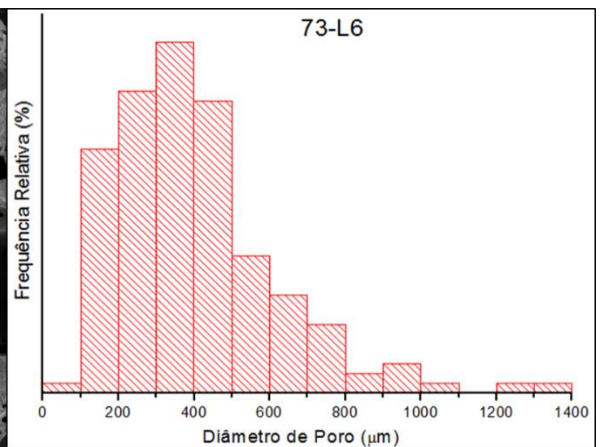
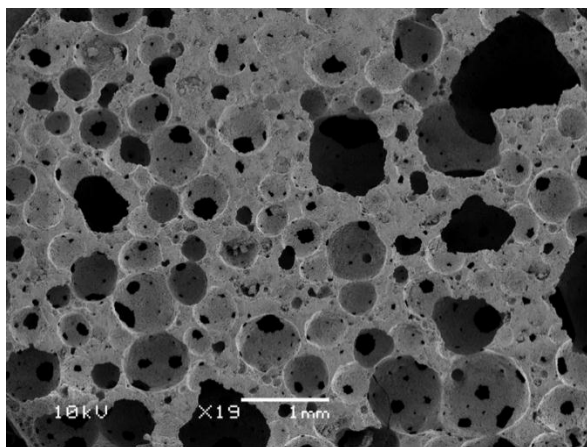
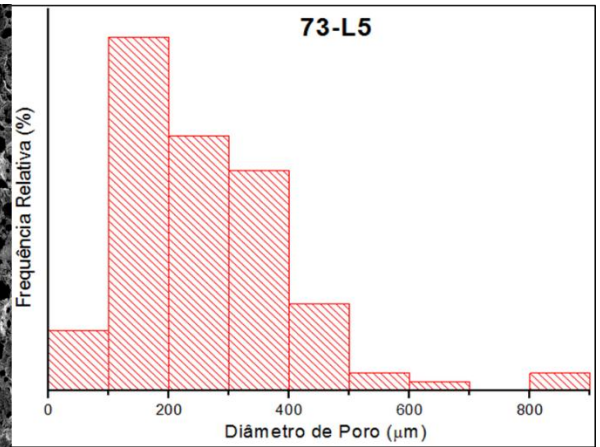
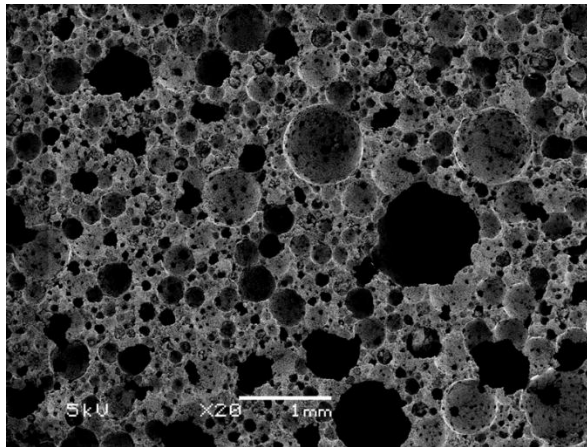
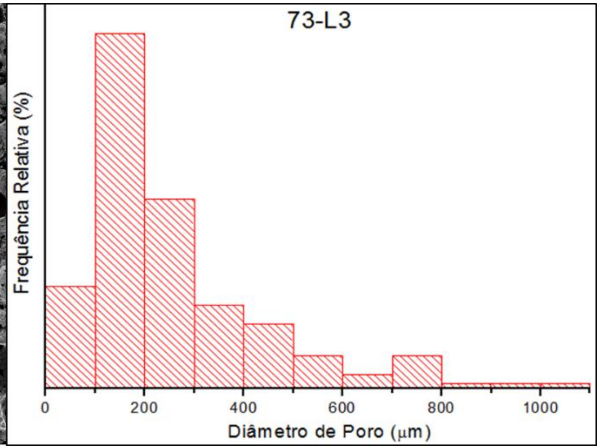
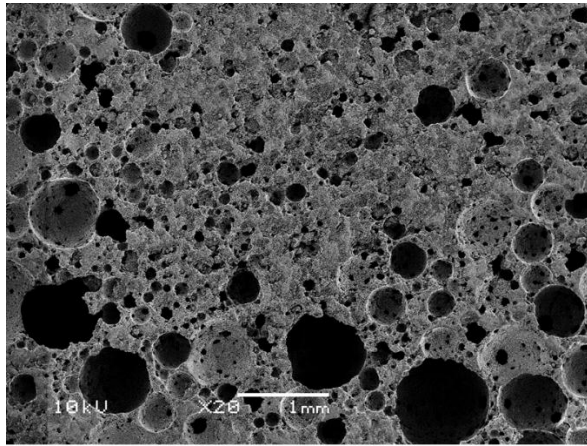


Fig. 5.11. Micrografias MEV para as amostras de cimento elaboradas com $L/P=0,73\text{mL/g}$. (a) 73-L3, (b) 73-L5, (c) 73-L6, (d) 73-L7, (e) 73-L8, (f) 73-L9.

Em contraste com a amostra controle, é clara a presença de macroporos e interconexões macroscópicas em todas as amostras observadas. As interconexões são poros que surgem pelo contato entre um macroporo com outro. É de grande importância que os poros estejam conectados entre eles, já que isto permite a permeação de fluídos biológicos através do material, tais como o sangue e outros nutrientes, favorecendo a vascularização e, por conseguinte, o crescimento de novo tecido ósseo a través da estrutura do cimento poroso. (Shepherd e Best, 2011). Os poros apresentam geometria esférica, indicando que o cimento reproduziu a morfologia da espuma líquida. Isto indica que o cimento conseguiu manter a estrutura da espuma, endurecendo antes do colapso da mesma. A micrografia correspondente à amostra 73-L3 (Fig. 5.11(a)) exibe o menor grau de porosidade de todas as amostras avaliadas, isto corrobora os valores calculados da Tabela 5.2, que indicam que o cimento espumado com menor porosidade total, menor macroporosidade e maior densidade foi o obtido com a solução L3. Além disso, a amostra que aparenta visualmente uma maior porosidade é 73-L9, a qual é apresentada na Figura 5.11(f). Resultados similares foram reportados por Ginebra e colaboradores (Ginebra *et al.*, 2007) e Montufar e colaboradores (Montufar *et al.*, 2010; Montufar *et al.*, 2011), os quais utilizaram o método de espumação direta em batedeira com albumina e Tween 80 como compostos estabilizadores da espuma. Apesar de os autores reportarem cimentos com alto grau de porosidade total e macroporosidade, os valores reportados neste estudo superam os reportados na literatura. A menor razão L/P e o menor tamanho de partícula usado pelos autores, pode ser uma das razões pelas quais a porosidade e macroporosidade foi menor do que as apresentadas na Tabela 5.2.

Embora todas as amostras apresentem macroporos com tamanhos maiores a 100 μ m, são claras as diferenças entre os diâmetros e a distribuição de tamanhos dos macroporos dependendo do corpo de prova observado. A Figura 5.12 exibe as distribuições de tamanho de poro obtidas pelo análise de imagem com *software ImageJ*. Os gráficos estão acompanhados da micrografia MEV do cimento analisada pelo programa.



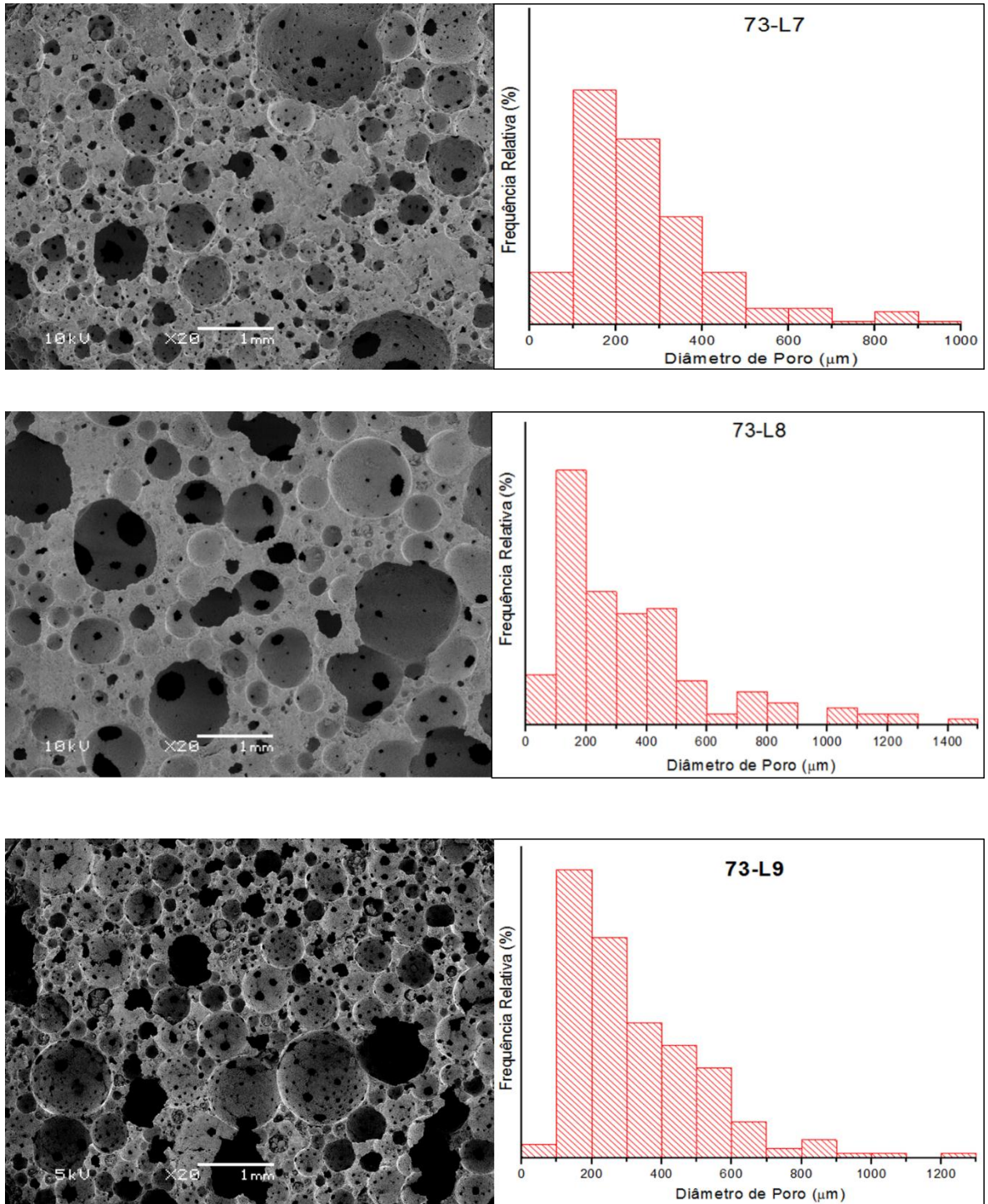


Fig. 5.12. Distribuição de tamanho de poros para as amostras de cimento espumadas com as soluções L3, L5, L6, L7, L8 e L9 com $L/P=0,73\text{mL/g}$.

A primeira observação em relação aos tamanhos de poro é que em todas as amostras, com exceção do cimento 73-L6, a maior frequência relativa da distribuição de diâmetros de

poro encontra-se na faixa de 100 – 200 μ m. No caso da amostra 73-L6, o pico máximo da distribuição encontra-se entre 300 – 400 μ m. Este resultado ratifica que as amostras preparadas, usando a metodologia proposta e os parâmetros descritos, podem ser consideradas como materiais aptos para serem utilizados em aplicações de regeneração óssea. Outrossim, todas as amostras exibem pelo menos um macroporo com tamanho igual ou maior do que 800 μ m. Isso pode ser causado por dois motivos: ou pela formação de uma bolha maior durante a injeção da pasta cimentícia no molde, ou por um processo conhecido como maturação de Ostwald (Schramm, 2005), que consiste na difusão de gás das bolhas menores para as maiores ocasionada pela diferença de pressões entre bolhas vizinhas de diferente tamanho. Como resultado, as bolhas menores tendem a desaparecer, enquanto as maiores aumentam seu tamanho. A espuma é um sistema termodinâmico instável devido à sua elevada área interfacial, a qual aumenta consideravelmente a energia livre do sistema. Por esta razão, depois da formação da espuma, acontecem fenômenos físicos, como por exemplo a maturação de Ostwald, visando à diminuição da energia livre e assim desestabilizando a espuma (Schramm, 2005). Como consequência, a coalescência da bolhas, isto é, o aumento da distribuição dos seus diâmetros, aumenta em função do tempo de vida da espuma. Uma vez que foi observado nas micrografias MEV que as amostras de cimento estudadas mantêm a morfologia das espumas, o seu tempo de pega deveria influenciar o tamanho dos poros. Porém, neste estudo não foi possível determinar os tempos iniciais e finais de pega dos cimentos pelo método de agulhas de Gillmore (ASTM C-266-89), pois a carga atribuída às agulhas (0,3 e 5MPa) excederam as resistências à compressão dos cimentos espumados antes e depois dos tempos de pega. A Tabela 5.3 apresenta o tamanho médio de poro das amostras de cimento espumado, calculado a partir da distribuição de tamanhos da Fig. 5.12.

Tabela 5.3. Tamanho médio de poro das amostras de cimento espumadas com L/P=0,73mL/g.

	Amostra					
	73-L3	73-L5	73-L6	73-L7	73-L8	73-L9
Tamanho médio de poro (μ m)	255,14	301,71	372,60	276,35	357,64	327,57

Comparando tanto as macroestruturas das amostras 73-L3 e 73-L7 (Fig. 5.11 (a) e (d)), quanto os seus tamanhos médios de poros com os dos outros cimentos, é possível concluir que estas amostras fabricadas com as soluções L3 e L7 apresentam macroporos e distribuições de tamanhos menores. Como foi exposto anteriormente, estas soluções apresentam o maior teor de Na_2HPO_4 , sendo 10wt% em L3 e 8,90wt% em L7. Fernandez e colaboradores (Fernández *et al.*, 1994) avaliaram a influência do hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) e outros sais no tempo de pega de um cimento de α -TCP, concluindo que a reação de endurecimento acontece em um menor tempo quando o cimento é misturado com uma fase líquida com uma elevada porcentagem do sal de fosfato. Assim, o aumento do teor de fosfato de sódio na fase líquida do sistema deveria diminuir o tempo da reação de pega do cimento. Isto foi comprovado por Ginebra e colaboradores (Ginebra *et al.*, 1994) ao estudar a variação da concentração do Na_2HPO_4 na solução aceleradora (0, 1, 2, 2,5, 3 e 4%). Os autores observaram uma clara diminuição dos tempos iniciais e finais de pega nos cimentos avaliados com o aumento da concentração do fosfato na solução, o qual foi conferido para diferentes relações L/P (0,30, 0,32, 0,34, 0,34, 0,36mL/g). Dessa maneira, considerando os menores tamanhos de poros das amostras 73-L3 e 73-L7 e o reportado por Fernandez (1994) e Ginebra (1994), poderia se afirmar que teores de hidrogenofosfato de sódio acima de 8,90wt% aceleram consideravelmente o endurecimento do cimento espumado elaborado com uma razão L/P igual a 0,73mL/g, obtendo assim macroestruturas com distribuições de tamanho de poro menores, graças a que os processos de maturação e coalescência da espuma são impedidos num menor tempo, em comparação com as amostras fabricadas com soluções de menor concentração de Na_2HPO_4 .

Por outra parte, segundo os resultados de estabilidade da solução apresentados na *Seção 5.2.2*, as espumas formadas com L3 e L7 foram as mais estáveis do grupo estudado, sendo 5,34 e 6,45 minutos seus tempos de estabilidade, respectivamente. A análise da superfície de resposta concluiu que o teor de Na_2HPO_4 influi significativamente no tempo de estabilidade da espuma, a qual aumenta com o incremento da concentração do fosfato. Um maior tempo de estabilidade significa uma diminuição na velocidade de segregação por gravidade do líquido através dos filmes finos que separam as bolhas (drenagem gravitacional) e, por conseguinte, um atraso na coalescência da espuma (Lyon, 2002). Além disso, ao

acrescentar o pó de α -TCP na espuma é esperado um aumento na viscosidade com a formação da pasta cimentícia, o que favorece a estabilidade do sistema. Como resultado, a drenagem de líquido e a difusão de ar entre bolhas é atrasada (Studart *et al.*, 2006). Assim, tanto o menor tempo de pega, quanto a maior estabilidade da espuma das amostras 73-L3 e 73-L7 produzem uma diminuição do tamanho médio de poro das amostras, em comparação com os cimentos elaborados com menores concentrações de fosfato de sódio.

A densidade aparente, a porosidade total e a macroporosidade calculadas para as amostras de cimento de α -TCP preparadas com L/P=0,60mL/g são mostradas na Tabela 5.4. Também foram calculadas a densidade e porosidade total das amostras sem surfactante e com 2,5wt% Na₂HPO₄.

Tabela 5.4. Densidade aparente, Porosidade total e Macroporosidade das amostras de cimento espumado fabricadas com uma razão L/P=0,60mL/g. Os valores estão acompanhados do desvio padrão entre parêntesis.

	Densidade Aparente (g/cm ³)	Porosidade Total (%)	Macroporosidade (%)
C - 0,60	1,475 (0,047)	53,25 (1,48)	-
60-L3	0,787 (0,023)	75,05 (0,73)	46,56 (3,05)
60-L5	0,502 (0,022)	84,09 (0,71)	65,92 (2,23)
60-L6	0,716 (0,018)	77,30 (0,58)	51,34 (2,52)
60-L7	0,681 (0,012)	78,43 (0,40)	53,85 (1,04)
60-L8	0,571 (0,050)	81,91 (1,59)	61,33 (2,57)
60-L9	0,420 (0,016)	86,70 (0,50)	71,50 (1,83)

Semelhantemente às amostras com maior razão L/P, ocorre uma diminuição da densidade aparente e um aumento da porosidade total das amostras, quando estas são elaboradas com a solução aceleradora e L110. Não apenas as amostras fabricadas com L5 e L9 apresentam de novo a menor densidade aparente e a maior macro- e porosidade total, como também o cimento fabricado com L3 foi o mais denso do grupo.

Comparando os valores da Tabela 5.4 com os da Tabela 5.3 pode-se perceber que existe um aumento na densidade das amostras preparadas com L/P=0,60mL/g e, como

resultado, uma diminuição na sua macro- e porosidade total. As densidades aparentes das amostras controle elaboradas com 0,73 e 0,60mL/g são $1,271 \pm 0,038$ e $1,475 \pm 0,047$, respectivamente. O leve aumento da densidade da amostra C-0,60 corrobora a afirmação sobre a influência do volume do líquido utilizado na porosidade final do cimento, onde uma redução da razão líquido/pó significa uma redução dos espaços entre as partículas de cimento (Ginebra *et al.*, 2012). As Figuras 5.13 e 5.14 apresentam as comparações das porosidades totais e macroporosidades dos corpos de prova obtidos com diferentes razões L/P.

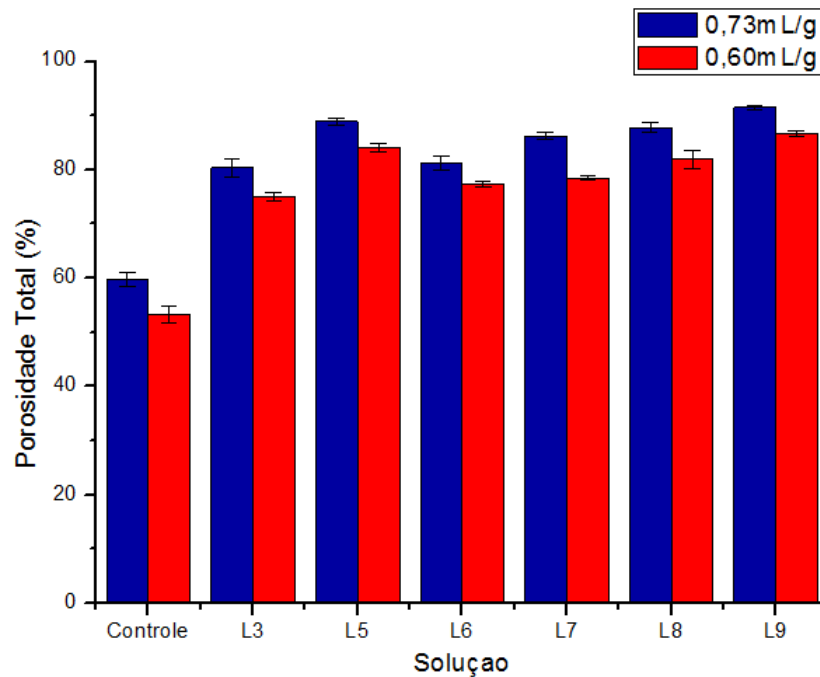


Fig. 5.13. Porosidade total dos cimentos elaborados com 0,73 e 0,60mL/g.

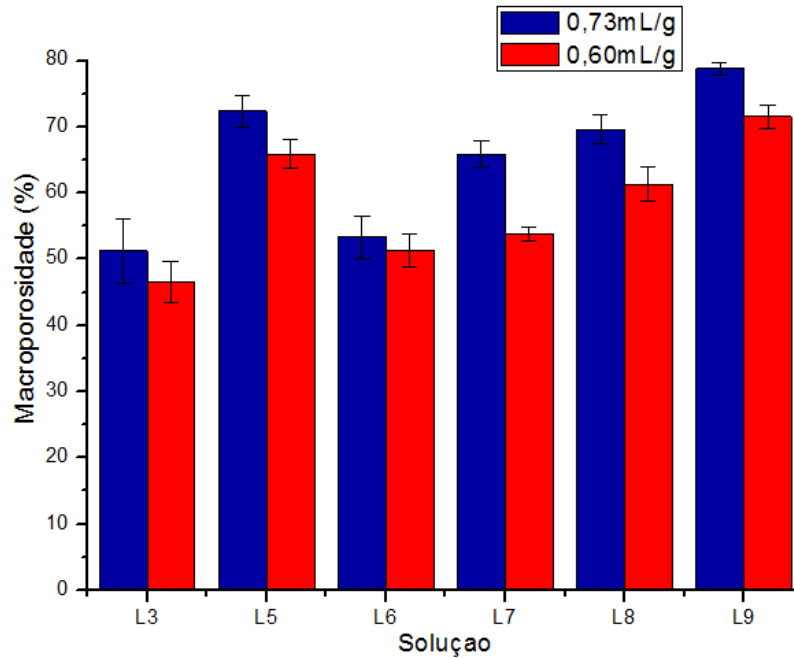


Fig. 5.14. Macroporosidade total dos cimentos elaborados com 0,73 e 0,60mL/g.

Além da diminuição da porosidade intrínseca do cimento elaborado com menor L/P, uma redução da razão L/P constituiu em um aumento da quantidade do pó utilizado para o mesmo volume de solução. O incremento da massa do sólido significa que uma porcentagem maior de partículas vão se adsorver na interface ar/líquido da espuma, aumentando a estabilidade do sistema e diminuindo as lacunas formadas pela coalescência das bolhas (Stuart *et al.*, 2006). A consequência pode ser observada nas comparações das Figuras 5.13 e 5.14, onde é evidente uma diminuição tanto da porosidade total, quanto da macroporosidade das amostras preparadas com L/P=0,60mL/g. Segundo a análise de variância, tanto o aumento da densidade quanto a diminuição da porosidade total de todas as amostras elaboradas com maior componente sólido foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Isto confirma o efeito relevante da proporção líquido/pó na macroestrutura final dos cimentos.

Os valores calculados para porosidade e macroporosidade, apresentados na Tabela 5.4, são similares aos reportados na literatura para métodos de espumação direta com uma elevada razão L/P (Montufar *et al.*, 2010; Montufar *et al.*, 2011; Unosson *et al.*, 2015; Zhang

et al., 2015). No entanto, não foram encontrados reportes de porosidades totais acima de 84% para cimentos espumados com uma razão líquido/pó igual o menor do que 0,60mL/g.

Por outra parte, Gauthier e colaboradores (Gauthier *et al.*, 1998) avaliaram o comportamento *In Vivo* de amostras macroporosas de fosfato de cálcio bifásico (BCP), as quais apresentavam dois graus diferentes de macroporosidade (40 e 50%). Os autores concluíram que os graus de macroporosidade estudados não foram determinantes na formação de novo tecido ósseo, sendo o tamanho de poro o parâmetro mais influente. Embora as macroporosidades calculadas das amostras 60-L5, 60-L8 e 60-L9 sofreram uma redução estatisticamente significativa ao diminuir a relação L/P ($p < 0,05$), esses valores continuam sendo maiores do que os reportados por Gauthier, e outros autores que pesquisaram o método de espumação direta. (Gauthier *et al.*, 1998; Ginebra *et al.*, 2007; Montufar *et al.*, 2010; Montufar *et al.*, 2011; Sarda *et al.*, 2003; Unosson *et al.*, 2015).

Micrografias MEV das amostras de cimento fabricadas com L/P=0,60mL/g estão apresentadas na Figura 5.15.

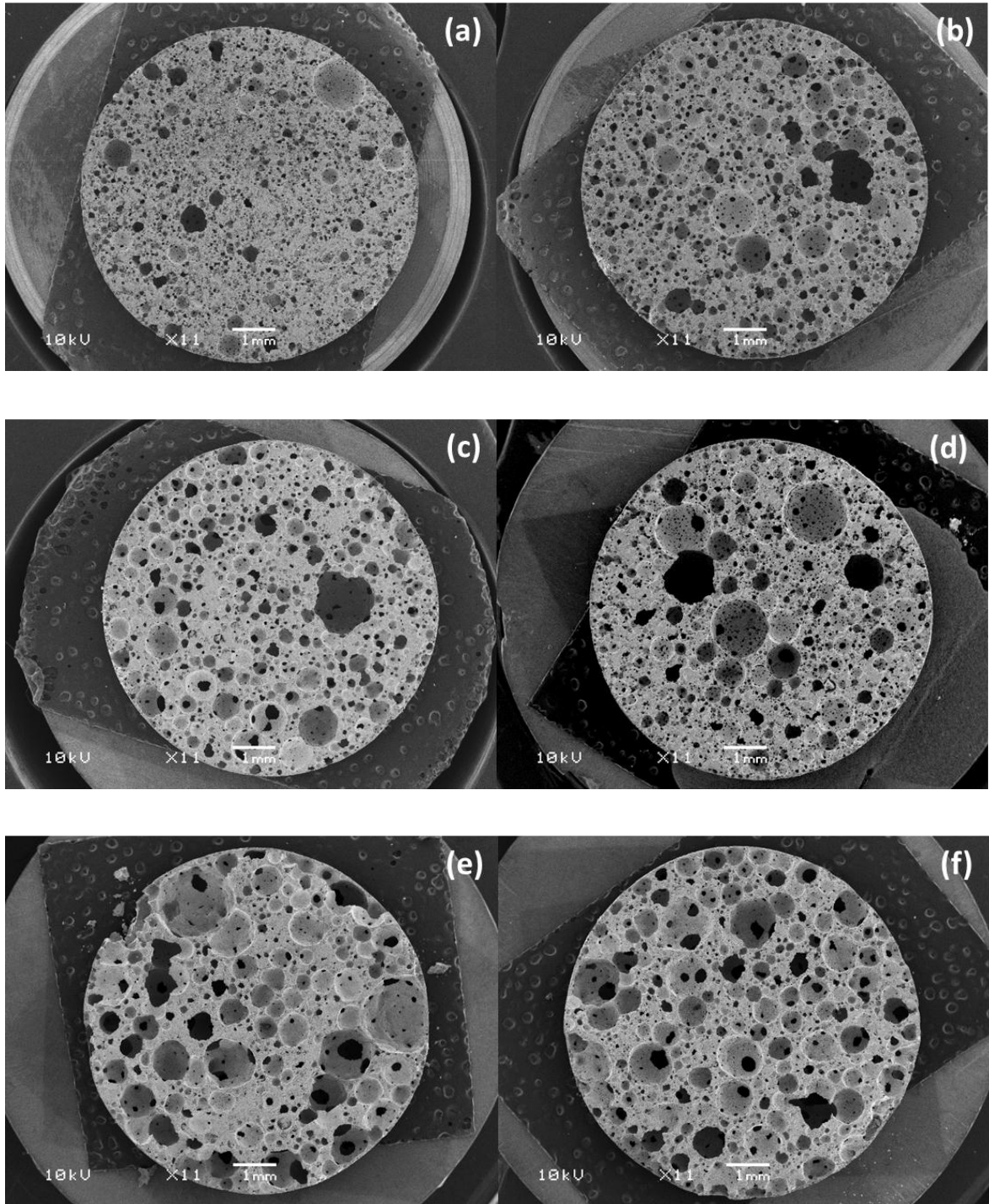


Fig. 5.15. Micrografias MEV para as amostras de cimento elaboradas com $L/P=0,60\text{mL/g}$. (a) 60-L3, (b) 60-L5, (c) 60-L6, (d) 60-L7, (e) 60-L8, (f) 60-L9.

Ao comparar as micrografias da Figura 5.15 com as das amostras com $L/P=0,73\text{mL/g}$ é possível observar claramente que houve uma redução na distribuição de tamanhos dos macroporos. Dois fatores influenciam principalmente esta variação: O primeiro é a maior estabilidade da pasta espumada. Isto é devido tanto ao aumento do volume de partículas adsorvidas quanto ao aumento da viscosidade da pasta. Não apenas um maior volume de partículas ao redor das bolhas dificulta a difusão de ar através das interfaces ar/cimento, como também um aumento da consistência da pasta aumenta a sua resistência à deformação. Portanto, a drenagem de líquido é reduzida e, por conseguinte, o grau de coalescência das bolhas e a maturação de Ostwald diminuem (Almirall *et al.*, 2004; Schramm, 2005; Studart *et al.*, 2006). O segundo fator é a diminuição da proporção do líquido em relação ao sólido. Uma razão L/P menor aumenta a velocidade de endurecimento do cimento, isto é, reduz o tempo de pega (Ginebra *et al.*, 1994). Como resultado, as amostras elaboradas com $L/P=0,60\text{mL/g}$ devem apresentar menores tempos de reação iniciais e finais, impedindo assim uma maturação prolongada da espuma. Unosson e colaboradores (Unosson *et al.*, 2015) estudaram diferentes proporções líquido/pó na elaboração de amostras de cimento macroporosas pelo método de espumação direta. Os autores observaram uma influência importante da razão L/P na porosidade e macroporosidade das amostras espumadas com Tween 80, por causa do tempo de pega inicial. Amostras com maior volume de solução aceleradora apresentaram maiores graus de porosidade e tamanho de poro, pois a maturação da espuma é favorecida em tempos iniciais de pega maiores. Para menores tempos de pega reportaram uma densificação do cimento. Além do exposto anteriormente, os autores avaliaram a maturação da espuma líquida para três tempos diferentes (1, 3 e 6 min). O cimento foi adicionado à espuma após 1 minuto, mas observaram que os cimentos apresentaram poros com tamanhos maiores aos observados para 1 minuto de maturação da espuma líquida. Isso demonstrou que a coalescência da espuma continuou mesmo com o aumento da fase sólida e a viscosidade da pasta cimentícia. No entanto, foi evidenciada maior coalescência nas amostras com maior L/P .

Nas micrografias também foram observadas interconexões entre os macroporos para todas as amostras avaliadas, algumas com tamanhos iguais ou maiores a $100\mu\text{m}$ (Figura

5.16). A amostra 60-L3 apresentou a menor distribuição de poros, enquanto as amostras com menor concentração de Na_2HPO_4 (60-L8 e 60-L5) parecem exibir os maiores tamanhos.

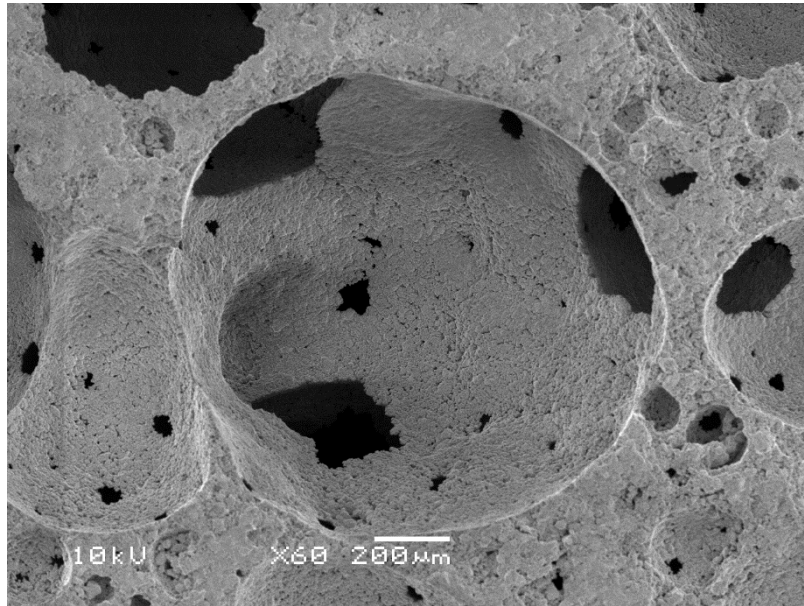
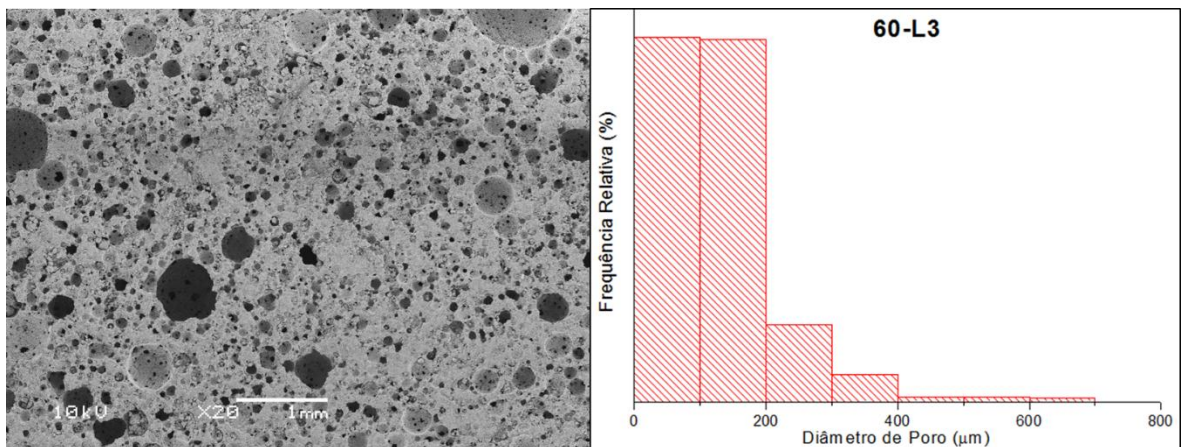
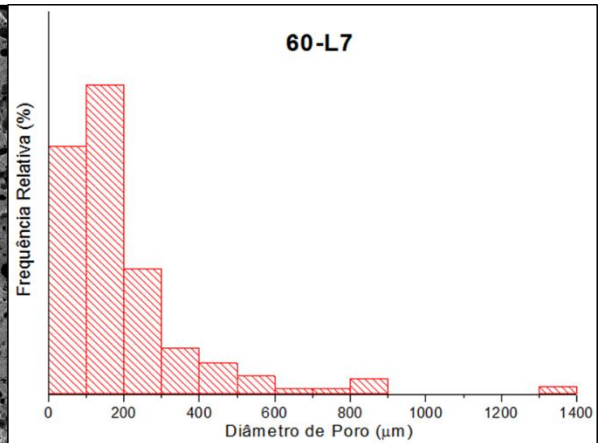
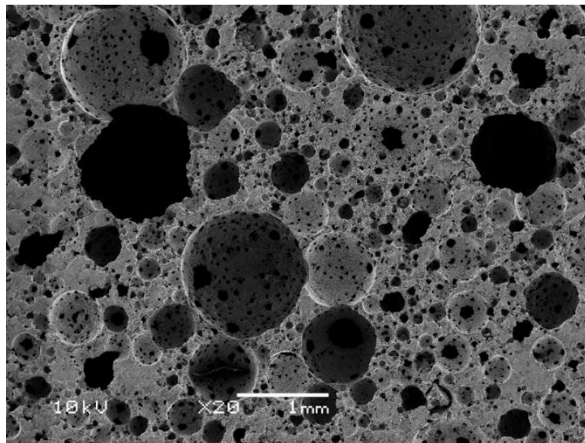
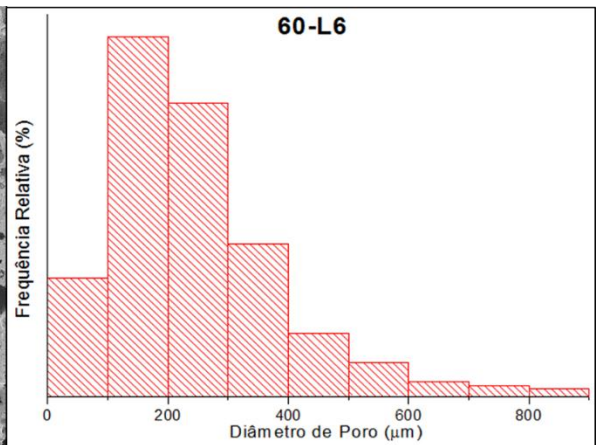
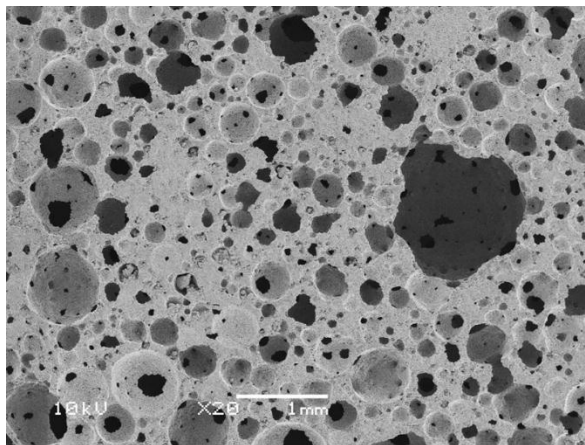
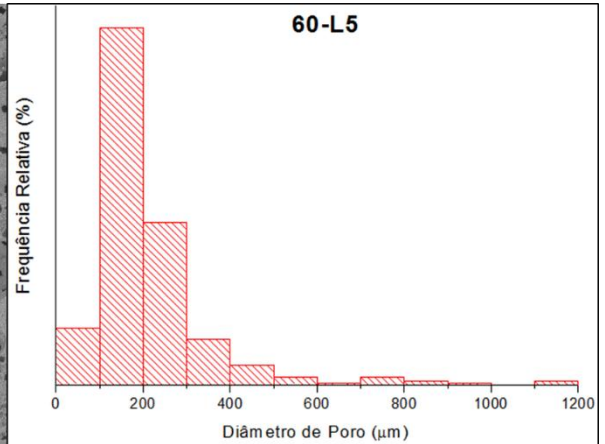
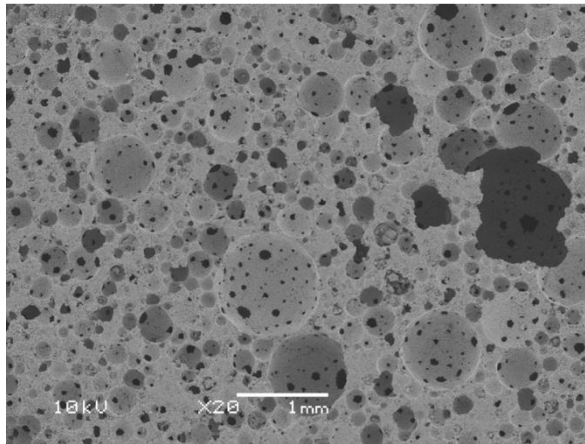


Fig. 5.16. Macroporo interconectado correspondente à amostra 60-L8.

A distribuição de tamanhos de poro das amostras elaboradas com $L/P=0,60\text{mL/g}$ estão apresentadas na Figura 5.17.





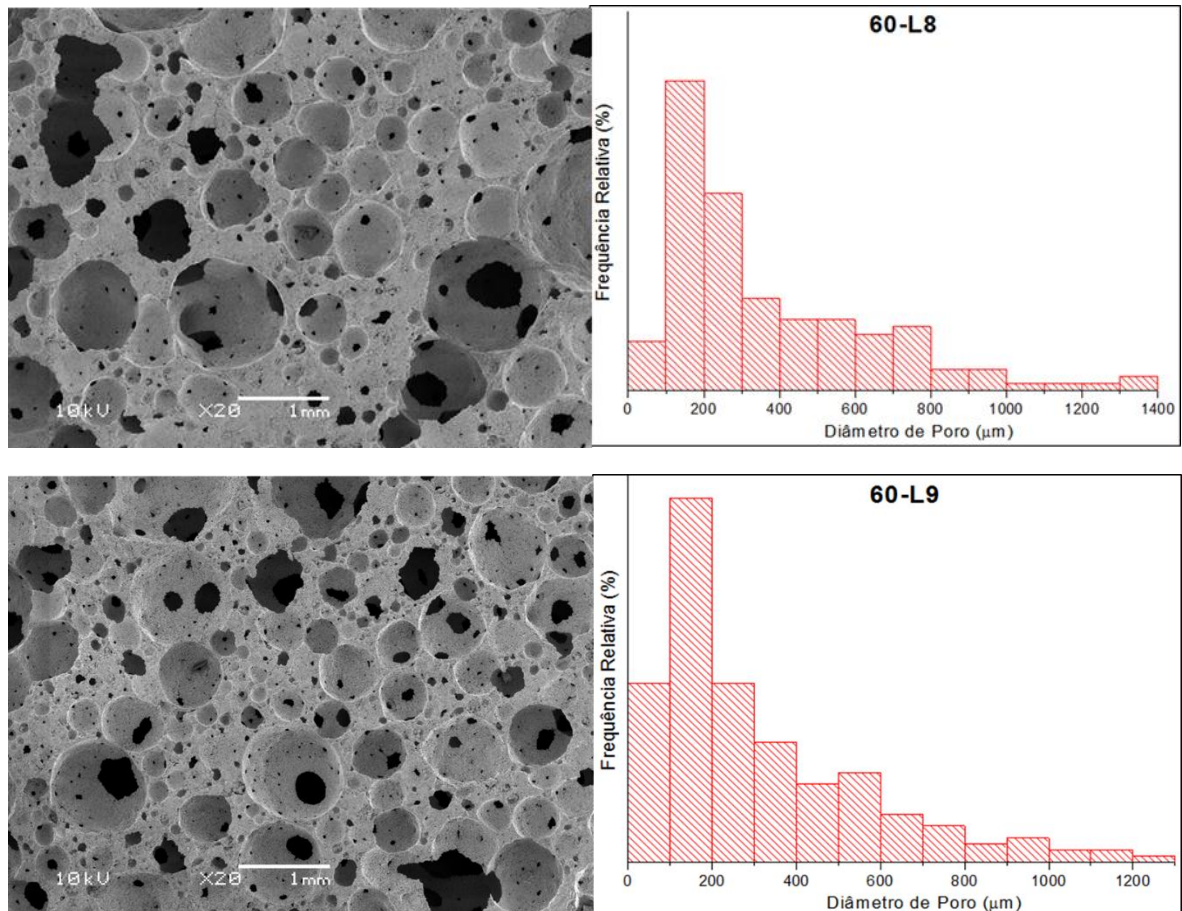


Fig. 5.17. Distribuição de tamanho de poros para as amostras de cimento espumadas com as soluções L3, L5, L6, L7, L8 e L9 com L/P=0,60mL/g.

Para todas as amostras, com exceção de 60-L3 e 60-L7, a porcentagem de poros com tamanhos na faixa de 100-200 μm supera amplamente a dos poros com 0-100 μm . Um tempo inicial de pega menor, favorecido pela redução da proporção de líquido/cimento e a maior concentração de hidrogenofosfato de sódio, restringe mais rapidamente o crescimento das bolhas da espuma. Em contraste, as amostras com menor teor de Na_2HPO_4 , ou seja 60-L8 e 60-L9, apresentaram o maior volume de macroporos com tamanhos maiores a 400 μm . Na literatura não tem sido reportado um tamanho de poro específico ideal para implantação dos cimentos ósseos. Alguns autores propõem um tamanho mínimo de macroporo de 100 μm para permitir a vascularização e o posterior crescimento de novo tecido ósseo dentro do material (Hulbert, Morrison, e Klawitter, 1972; Simske, Ayers, e Bateman, 1997), no entanto outros

autores afirmam que quanto maior for a distribuição de diâmetros de poro no material, maior a taxa de formação e crescimento de tecido ósseo (Gauthier *et al.*, 1998; LeGeros, Daculsi, e LeGeros, 2008; Shimazaki e Mooney, 1985). A Tabela 5.5 apresenta o tamanho médio de poro calculado para as amostras da Fig. 5.17.

Tabela 5.5. Tamanho médio de poro das amostras de cimento espumadas com L/P=0,60mL/g.

Tamanho médio de poro (μm)	Amostra					
	60-L3	60-L5	60-L6	60-L7	60-L8	60-L9
	134,79	212,37	252,73	205,36	322,15	310,91

Embora os tamanhos médios de poro tenham decrescido significativamente em relação às amostras elaboradas com L/P=0,73mL/g, eles ainda são maiores do que 100 μm , mesmo na amostra 60-L3. Os cimentos fabricados com L8 e L9 apresentaram os maiores tamanhos médios de macroporo. Portanto, desde o ponto de vista da macroestrutura do cimento, considerando também o grau porosidade e macroporosidade, a amostra 60-L9 seria a amostra mais adequada do grupo com L/P=0,60mL/g para ser utilizada em aplicações de preenchimento ósseo.

Após avaliar a porosidade total, a macroporosidade e os tamanhos de macroporos das amostras de cimento fabricadas com diferentes proporções líquido/cimento, pode-se afirmar, segundo as tendências observadas na análise para uma razão L/P constante, que tanto a porosidade quanto a macroporosidade dos cimento são função da espumabilidade da solução utilizada, o qual é coerente, pois um maior volume de espuma representa um maior volume de ar introduzido ao cimento. Por outro lado, a distribuição e o tamanho médio de poro das amostras também é função da concentração de hidrogenofosfato de sódio. Por último, todos esses parâmetros também são função da proporção líquido/pó utilizada. Assim, é possível desenhar um cimento macroporoso de acordo com as especificações requeridas a partir de um controle destas propriedades macroestruturais.

5.4.3. Resistência à Compressão

A resistência à compressão em função da porosidade total das espumas de cimento reagidas durante 72 horas em solução de Ringer é apresentada nas figuras 5.18 (L/P=0,73mL/g) e 5.19 (L/P=0,60mL/g).

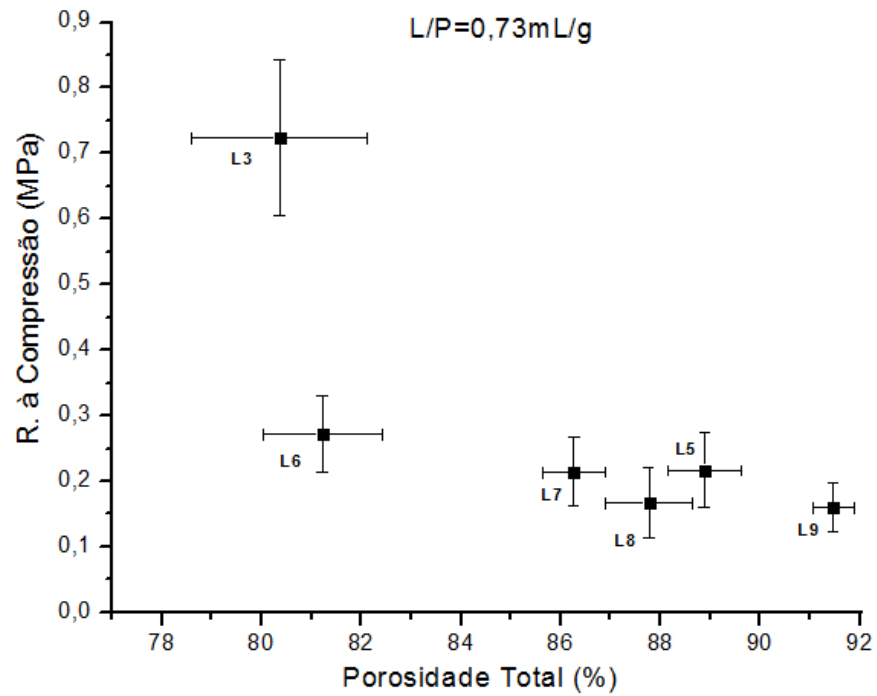


Fig. 5.18. Resistência à compressão em função da porosidade total das amostras de cimento elaboradas com L/P=0,73mL/g.

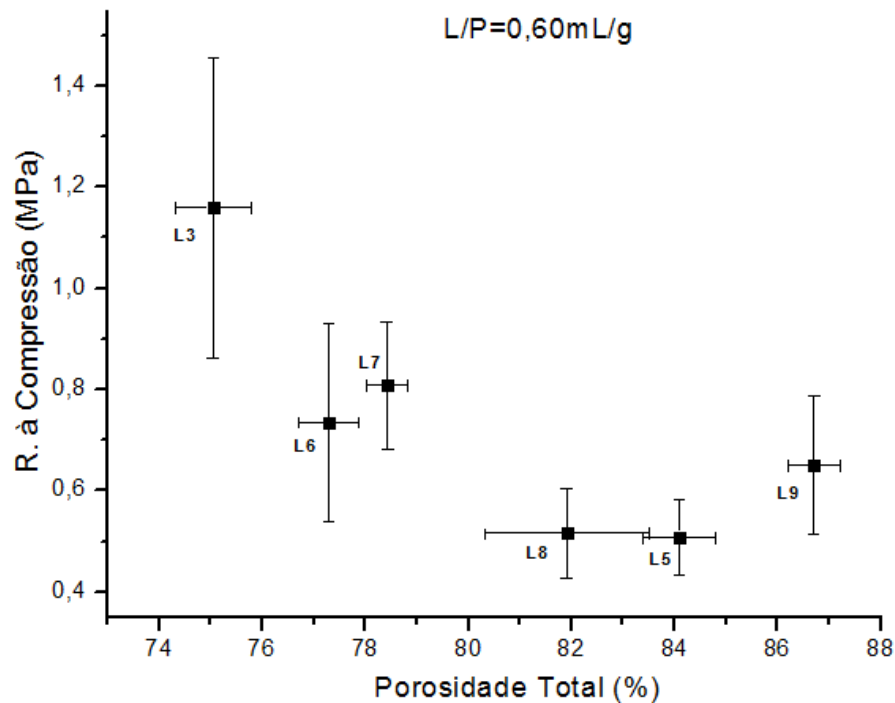


Fig. 5.19. Resistência à compressão em função da porosidade total das amostras de cimento elaboradas com $L/P=0,60\text{mL/g}$.

Em ambas figuras é possível observar que a resistência mecânica das amostras de cimento diminui com o aumento da porosidade total dos corpos de prova. As propriedades mecânicas dos cimentos dependem principalmente da porosidade (distribuição e tamanho médio de poro) e as características microestruturais, isto é, quantidade, tamanho e distribuição dos cristais de apatita (Zhang *et al.*, 2014). Assim, a presença de macro- e microporos aumenta os locais onde são nucleados concentradores de esforços, desestabilizando mais rapidamente a integridade estrutural dos corpos de prova. Também é importante explicar que os cristais de CDHA não estão quimicamente ligados entre eles. A resistência mecânica é consequência de um emaranhamento físico dos cristais.

As resistências à compressão das amostras variaram nas faixas de 0,72 – 0,16MPa ($L/P=0,73\text{mL/g}$) e 1,15 – 0,64MPa ($L/P=0,60\text{mL/g}$), o qual está de acordo com o reportado com outros autores para cimentos com macroporosidade induzida (de Oliveira Renó *et al.*, 2014; Ginebra *et al.*, 2007; Montufar *et al.*, 2010; Valle *et al.*, 2007). Além disto, pode-se afirmar que a variação da resistência à compressão em função da porosidade total exhibe um

comportamento exponencial decrescente com o aumento da porosidade. Tonyan e Gibson (Tonyan e Gibson, 1992) propuseram um modelo matemático para prever o comportamento mecânico a compressão de um cimento macroporoso:

$$\sigma = \sigma_0(\rho_{ap})^m e^{-bP} \quad (5.1)$$

Onde σ_0 é a resistência à compressão do cimento de α -TCP com 0% de porosidade, isto é, 112MPa (Ginebra *et al.*, 2007); ρ_{ap} é a densidade aparente do material; P é a macroporosidade do cimento; e m e b são constantes próprias do cimento avaliado. O efeito da micro- e macroporosidade do cimento na resistência mecânica é ponderado no modelo separadamente, considerando que o cimento apresenta uma matriz intrinsecamente microporosa, a qual é modificada com a sobreposição de macroporos na sua estrutura (Ginebra *et al.*, 2007).

A Figura 5.20 apresenta a comparação das resistências à compressão das amostras elaboradas com a mesma solução e diferente proporção L/P.

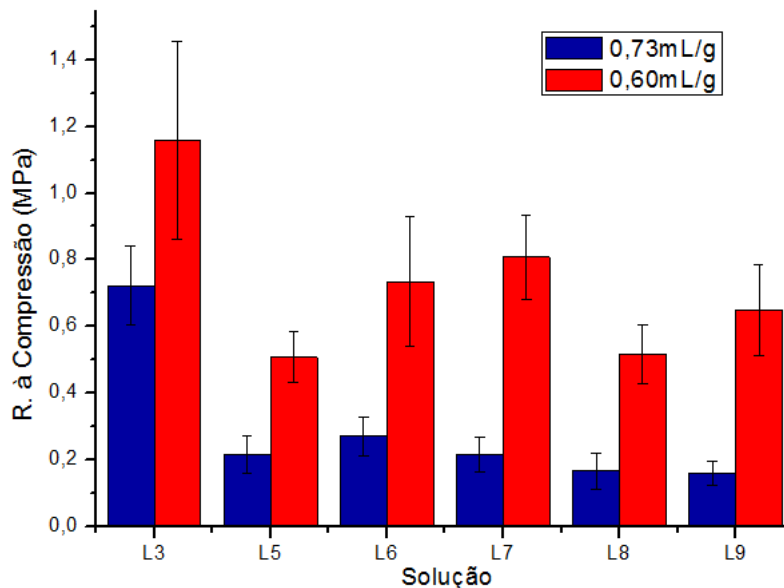


Fig. 5.20. Resistências à compressão das espumas de cimento de α -TCP elaboradas com diferentes L/P.

Os cimentos obtidos com menor proporção líquido/cimento exibiram maiores valores de resistência mecânica. Isto pode ser explicado pela redução da porosidade total, bem como a diminuição dos diâmetros de poro. Foi explicado anteriormente, que uma menor proporção de líquido em relação à fase sólida do cimento diminui a porosidade total do cimento e, ao mesmo tempo, favorece uma redução do tamanho médio dos poros em virtude do endurecimento mais rápido da estrutura do cimento. Feng e colaboradores (Feng *et al.*, 2010) estudaram o comportamento mecânico de cimentos de fosfato de cálcio macroporosos com similar grau de porosidade total, mas com tamanhos médios de poro diferentes. Os autores encontraram que a resistência à compressão do cimento avaliado é inversamente proporcional ao tamanho de macroporo. Assim, o menor grau de porosidade total e os menores tamanhos de poro das amostras preparadas com L/P=0,60mL/g favoreceram o aumento da resistência, em comparação com os cimentos com L/P=0,73mL/g. Todas as diferenças entre as resistências à compressão das amostras espumadas com a mesma solução foram altamente significativas ($p<0,01$). Contudo, ao comparar as amostras 73-L7 e 60-L9, pode-se observar que tanto as suas porosidades (Tabelas 5.2 e 5.4), quanto seus tamanhos médio de poro (Tabelas 5.3 e 5.5) são similares. Por consequência, as amostras deveriam, teoricamente, apresentar uma resistência à compressão similar. Pelo contrário, inesperadamente, a amostra 60-L9 apresentou uma resistência igual a $0,65\pm 0,14$ MPa, enquanto a do cimento 73-L7 foi igual a $0,21\pm 0,05$ MPa, isto é, a resistência à compressão da 60-L9 é três vezes maior. Como foi mostrado na Tabela 5.1, esses cimentos foram espumados com o mesmo teor de L110 na fase líquida (4,30wt%), porém a concentração de Na_2HPO_4 foi 8,90wt% em L7 e 3,60wt% em L9. Em outras palavras, isto indicaria que um aumento do teor de hidrogenofosfato de sódio na fase líquida afeta o comportamento mecânico do cimento. Este fenômeno não está claramente explicado na literatura, mas já foi reportado por Fernández e colaboradores (Fernández *et al.*, 1994) e por Khairoun e colaboradores (Khairoun *et al.*, 1998). Em ambos estudos o incremento da concentração de Na_2HPO_4 resultou em uma diminuição da resistência à compressão de cimentos microporosos de α -TCP.

Tomando em consideração os resultados obtidos, bem como a experiência manipulando as amostras, foi escolhida a proporção líquido/cimento L/P=0,60mL/g como a mais apropriada para continuar o estudo. As baixas resistências mecânicas dos cimentos

espumados com menor quantidade de fase sólida impediram a sua adequada confecção e manuseio, fraturando-se facilmente durante a manipulação. No entanto, mesmo que tenha havido um aumento da resistência com a diminuição da razão líquido/pó, as amostras preparadas com estes parâmetros não podem ser implantadas em locais ortopédicos que exijam materiais adequados para suportar elevadas cargas mecânicas.

5.5. Caracterização *In Vitro*

5.5.1. Imersão em SBF

Para o teste de bioatividade foram avaliadas as amostras elaboradas com L/P=0,60mL/g. A Tabela 5.8 apresenta os valores de degradação das amostras após os diferentes tempos de imersão em SBF avaliados.

Tabela 5.6. Variação da massa das amostras de cimento de α -TCP após imersão em SBF por diferentes períodos de tempo.

Amostra	Ganho de massa (%)			
	1D	3D	7D	21D
60-L3	0 (0)	0,68 (0,59)	1,34 (0,68)	2,13 (1,87)
60-L5	0 (0)	0,53 (0,92)	2,64 (0,94)	5,28 (0,84)
60-L6	0 (0)	1,48 (0,97)	3,06 (0,11)	4,51 (0,31)
60-L7	0 (0)	0,47 (0,27)	2,13 (0,95)	4,98 (2,89)
60-L8	0 (0)	1,20 (1,04)	3,36 (0,24)	4,17 (1,09)
60-L9	0 (0)	2,09 (0,15)	4,00 (0,14)	5,91 (0,07)

Observou-se que todas as amostras ganharam massa após os primeiros 3 dias de imersão, aumentando o ganho de massa com o incremento dos dias em solução. Este comportamento foi reportado por Ishikawa e colaboradores (Ishikawa *et al.*, 1994) e por Liu e colaboradores (Liu, Chen, e Ducheyne, 2008), que atribuíram o ganho de massa ao efeito combinado da dissolução do cimento e da precipitação de uma camada de apatita superficial, a qual aumenta seu tamanho com o incremento do tempo de imersão. Evidenciou-se que a amostra 60-L3 exibiu a menor porcentagem de ganho de massa. Uma possível explicação para isto seria o menor grau de porosidade total, macroporosidade e permeabilidade das amostras elaboradas com a solução L3. Assim, a SBF possivelmente não conseguiu permear

totalmente as amostras, diminuindo o volume de apatita precipitada sobre o material. A Figura 5.30 apresenta o aumento da massa em função do tempo de imersão em SBF da amostra 60-L9.

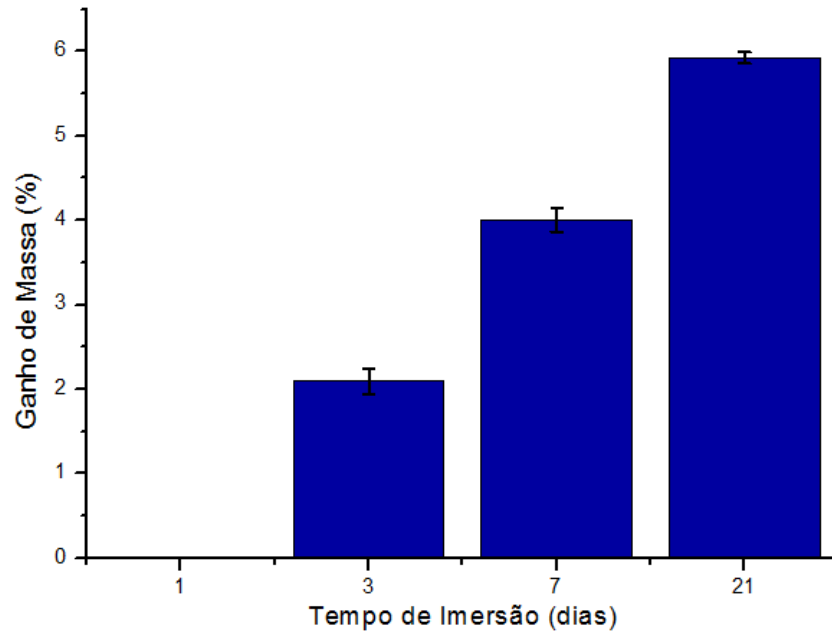


Fig. 5.21. Variação da massa da amostra 60-L9 após imersão em SBF por vários períodos de tempo.

Após 1 dia em solução não houve um ganho de massa nas amostras. Se houve, ele não foi detectado pela sensibilidade da balança eletrônica utilizada na determinação dos pesos antes e depois da imersão. O aumento da porcentagem de massa apresentou um comportamento linear em relação ao incremento do tempo de imersão. Estes resultados são semelhantes aos reportados por Morejón (Morejón, 2011) para a imersão de cimentos densos de α -TCP em SBF durante 7, 14 e 21 dias. O teste de imersão em SBF indica o caráter bioativo do material avaliado pela nucleação e formação de uma camada de apatita (Kokubo e Takadama, 2006). A Figura 5.33 apresenta as micrografias MEV correspondentes à amostra 60-L9 para os diferentes tempos de imersão em SBF.

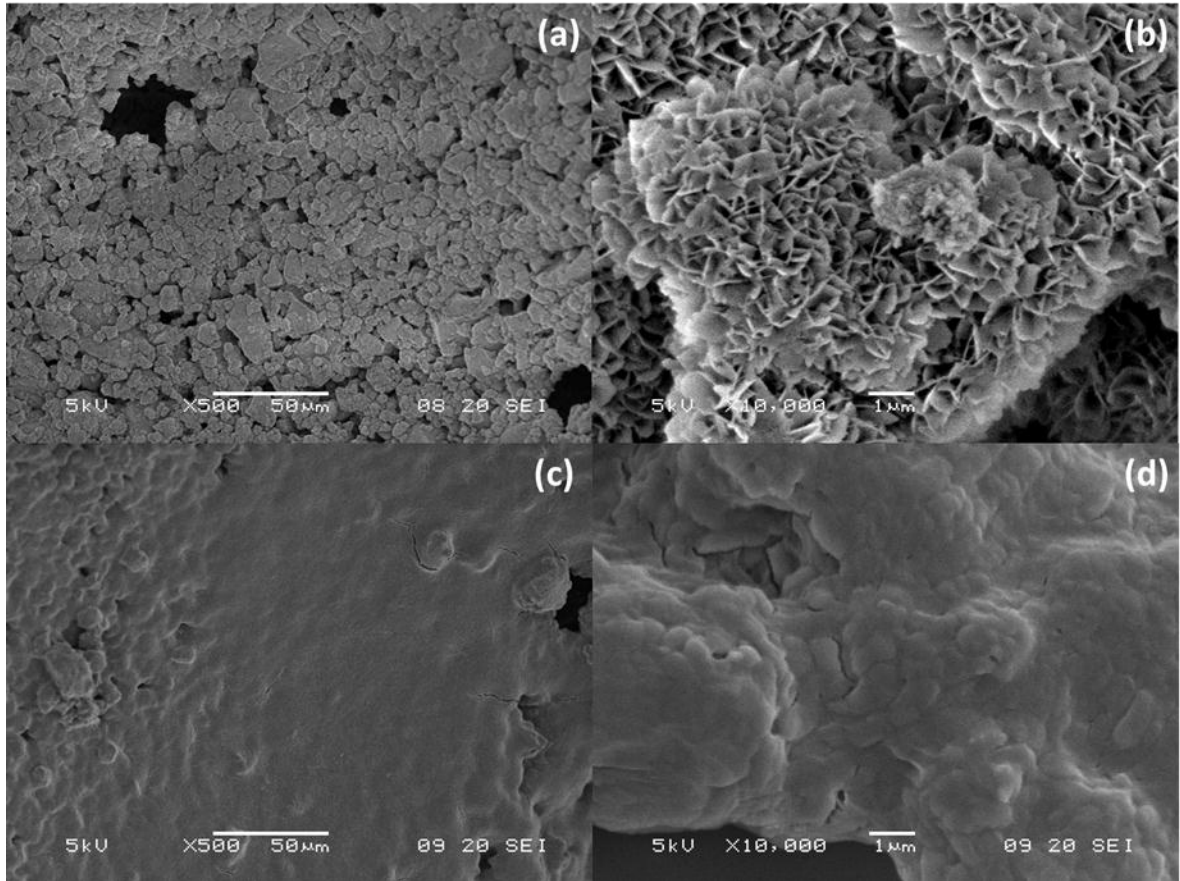


Fig. 5.22. Micrografias MEV da amostra 60-L9 imersa em SBF por: 1 dia (a) e (b) e 21 dias (c) e (d).

Não foram observadas evidências de nucleação de apatita nas micrografias correspondentes às amostras imersas por 1 dia. No entanto, nas micrografias pertencentes ao tempo de imersão de 21 dias, foi observada a formação de uma camada contínua ao redor das partículas de cimento reagido, envolvendo os cristais petaloides de CDHA. Pode-se afirmar que essa camada obedece à nucleação do mineral apatítico, o qual é esperado num material bioativo em contato com uma solução que apresente uma concentração iônica similar ao plasma humano (Kokubo e Takadama, 2006). A morfologia desta camada é similar à obtida por Ni e colaboradores (Ni e Wang, 2002) para um substrato de Hidroxiapatita reforçado com polihidroxibutirato, recoberto por procedimentos biomiméticos.

Os estudos de degradação das amostras macroporosas elaboradas pela metodologia proposta neste estudo indicam que, como era esperado, os cimentos obtidos são bioativos, já

que foi evidenciada uma camada de apatita sobre a sua superfície após a imersão em SBF. A formação deste mineral no material quando estiver implantado *In Vivo* favoreceria a ligação química do implante com o tecido ósseo, obtendo assim um maior acoplamento do material no local de implante (Kokubo e Takadama, 2006).

6. CONCLUSÕES

Foi possível a obtenção de peças macroporosas de cimento de α -TCP a partir da espumação manual da fase líquida e posterior mistura com o pó de cimento no sistema proposto, composto de duas seringas conectadas com uma válvula de PVC. Assim, a variação dos parâmetros estudados, isto é, concentração de Na_2HPO_4 , concentração de surfactante e proporção líquido/pó, permitiram controlar a macroestrutura final dos cimentos. Desse modo, é possível projetar e elaborar amostras de cimento ósseo de fosfato de cálcio com valores desejados ou requeridos de porosidade total, macroporosidade e tamanho médio de poro.

Quanto à síntese e caracterização do cimento de α -TCP observou-se que:

- Obteve-se α -TCP como fase única ou maioritária pela metodologia de síntese de via úmida;
- O tamanho médio de partícula obtido após a moagem manual e peneiramento foi maior do que os reportados na literatura.
- O pó de α -TCP apresentou uma ampla distribuição de tamanhos de partícula.

Quanto à avaliação das soluções com diferentes concentrações de Na_2HPO_4 e surfactante:

- A espumabilidade das soluções contendo Lutensol ON 110 foi muito maior do que a das soluções com Lauril Sulfato de Sódio.
- Foi possível evidenciar nas superfícies de resposta a concentração micelar crítica (CMC) de ambos surfactantes.
- A concentração de Na_2HPO_4 não influenciou significativamente a espumabilidade das soluções com Lutensol, mas foi determinante na estabilidade da espuma para altas concentrações de surfactante.
- Foram selecionadas as soluções L3, L5, L6, L7, L8 e L9 para continuar a parte experimental do estudo, pois elas apresentaram o maior incremento de volume e a maior estabilidade entre as soluções com Lutensol.

Na elaboração dos corpos de prova observou-se que:

- A proporção líquido/pó de 0,5mL/g não foi adequada para a obtenção de uma pasta cimentícia homogênea por mistura manual devido à sua elevada viscosidade.
- Após duas semanas, foi evidente a precipitação de cristais nas soluções com maior concentração de Na_2HPO_4 , mudando completamente as concentrações iniciais das soluções.

Na caracterização das amostras observou-se que:

- A transformação de α -TCP em CDHA não foi completa após 3 dias de imersão em solução de Ringer. Não houve influência nem do Na_2HPO_4 nem do surfactante na cinética de transformação. O elevado tamanho de partícula parece diminuir a reatividade do pó de cimento.
- A porosidade total e macroporosidade são função da espumabilidade inicial da solução, enquanto o tamanho médio de poro é função da estabilidade e concentração de Na_2HPO_4 . A razão L/P influencia indiretamente ambos parâmetros.
- A baixa resistência à compressão das amostras macroporosas impossibilita a sua aplicação em locais que estejam expostos a cargas mecânicas elevadas.

Quanto à caracterização *In Vitro* das amostras:

- A imersão do material em SBF levou a um aumento da porcentagem de massa, devido à formação de uma camada superficial de apatita após 7 dias de imersão em SBF.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Algumas sugestões para se dar continuidade a este trabalho são:

- Diminuir o tamanho médio de partícula por diferentes tempos de moagem em moinho de bolas.
- Desenhar um equipamento que consiga espumar e misturar a pasta de cimento mecanicamente, com o sistema de seringas, para melhorar a reprodutibilidade.
- Estudo sobre a cinética de reação dos cimentos e a determinação dos seus tempos de pega e coesão.
- Avaliar diferentes aditivos que melhorem a resistência mecânica dos cimentos, sem diminuir consideravelmente a porosidade total das amostras.
- Avaliar diferentes metodologias que permitam o aumento da coesão do cimento em meio líquido e estudar o comportamento da pasta injetada *In Vivo*.
- Estudar a factibilidade de utilizar as amostras macroporosas de cimento como carreadores de liberação controlada de fármacos.

8. REFERÊNCIAS

- Almirall, A., Larrecq, G., Delgado, J. a., Martínez, S., Planell, J. a., & Ginebra, M. P. (2004). Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials*, 25(17), 3671–3680.
- Bohner, M. (2000). Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, 31.
- Bohner, M. (2001). Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal*, 10(SUPPL. 2), 114–121.
- Bohner, M., Dobelin, N., & Baroud, G. (2006). Theoretical and experimental approach to test the cohesion of calcium phosphate pastes. *European Cells & Materials*, 12, 26–35.
- Brown, W. E., & Chow, L. C. (1985). Dental restorative cement pastes.
- Burg, K. J., Porter, S., & Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21(23), 2347–2359.
- Cama, G. (2014). 1 - Calcium phosphate cements for bone regeneration. In P. Dubruel & S. V. B. T.-B. for B. R. Vlierberghe (Eds.), *Biomaterials for Bone Regeneration* (pp. 3–25). Woodhead Publishing.
- Carrodeguas, R. G., & De Aza, S. (2011). α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 7(10), 3536–3546.
- Chakraborty, T., Chakraborty, I., & Ghosh, S. (2011). The methods of determination of critical micellar concentrations of the amphiphilic systems in aqueous medium. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(3), 265–270.
- Cranin, A. N. (1985). Biomaterials: An interfacial approach. *Journal of Biomedical Materials Research*, 19(5), 611–612.

- De Barros Coelho, M., & Magalhães Pereira, M. (2005). Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: Effect of surfactant type and concentration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 75(2), 451–456.
- de Oliveira Renó, C., Pereta, N. C., Bertran, C. a., Motisuke, M., & de Sousa, E. (2014). Study of in vitro degradation of brushite cements scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2297–2303.
- del Real, R. P., Ooms, E., Wolke, J. G. C., Vallet-Regí, M., & Jansen, J. a. (2003). In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 65, 30–36.
- del Real, R., Wolke, J., Vallet-Regí, M., & Jansen, J. (2002). A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 23, 3673–3680.
- Dorozhkin, S. V. (2007). Calcium orthophosphates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 42(4), 1061–1095.
- Dorozhkin, S. V. (2008). Calcium orthophosphate cements for biomedical application. *Journal of Materials Science*, 43(3913229), 3028–3057.
- Dorozhkin, S. V. (2009). Calcium orthophosphate cements and concretes. *Materials*, 2, 221–291.
- Dorozhkin, S. V. (2010). Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, 31(7), 1465–1485.
- Dorozhkin, S. V. (2013). Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations. *Journal of Functional Biomaterials*, 4(4), 209–311.
- dos Santos, L. a, Carrodéguas, R. G., Rogero, S. O., Higa, O. Z., Boschi, a O., & de Arruda, a C. F. (2002). Alpha-tricalcium phosphate cement: “in vitro” cytotoxicity. *Biomaterials*, 23(9), 2035–2042.

- dos Santos, L. A. (2008). *Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras*. São Paulo: Blucher Acadêmicos.
- Durucan, C., & Brown, P. W. (2002). Reactivity of alpha-tricalcium phosphate. *Journal of Materials Science*, 37(5), 963–969.
- Elliot, J. (1994). *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Amsterdam: Elsevier.
- Exerowa, D., & Kruglyakov, P. M. (1997). *Foam and Foam Films. Theory, Experiment and Applications* (1st ed.). Elsevier Science.
- Feng, B., Guolin, M., Yuan, Y., Changshen, L., Zhen, W., & Jian, L. (2010). Role of macropore size in the mechanical properties and in vitro degradation of porous calcium phosphate cements. *Materials Letters*, 64(18), 2028–2031.
- Fernández, E., Boltong, M. G., Ginebra, M. P., Bermudez, O., Driessens, F. C. M., & Planell, J. A. (1994). Common ion effect on some calcium phosphate cements. *Clinical Materials*, 16(2), 99–103.
- Fernández, E., Gil, F. J., Ginebra, M. P., Driessens, F. C., Planell, J. a, & Best, S. M. (1999). Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 10, 169–176.
- Frost, & Sullivan. (2007). U.S. bone grafts and bone graft substitutes markets.
- Funk, J. E., & Dinger, D. R. (1994). *Manufacturing, Predictive Process Control of Crowded Particulate Suspensions Applied to Ceramic*. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Gauthier, O., Bouler, J. M., Aguado, E., Pilet, P., & Daculsi, G. (1998). Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*, 19, 133–139.
- Ginebra, M. P., Canal, C., Espanol, M., Pastorino, D., & Montufar, E. B. (2012). Calcium

- phosphate cements as drug delivery materials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(12), 1090–1110.
- Ginebra, M. P., Delgado, J.-A., Harr, I., Almirall, A., Valle, S. Del, & Planell, J. A. (2007). Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80(2), 351–361.
- Ginebra, M. P., Driessens, F. C. M., & Planell, J. a. (2004). Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: A kinetic analysis. *Biomaterials*, 25, 3453–3462.
- Ginebra, M. P., Espanol, M., Montufar, E. B., Perez, R. a., & Mestres, G. (2010). New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*, 6(8), 2863–2873.
- Ginebra, M. P., Fernandez, E., Boltong, M. G., Bermudez, O., Planell, J. A., & Driessens, F. C. M. (1994). Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with the short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. *Clinical Materials*, 17(2), 99–104.
- Ginebra, M. P., Fernández, E., De Maeyer, E. a, Verbeeck, R. M., Boltong, M. G., Ginebra, J., ... Planell, J. a. (1997). Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research*, 76(4), 905–912.
- Ginebra, M. P., Fernández, E., Driessens, F. C. M., & Planell, J. a. (1999). Modeling of the Hydrolysis of α -Tricalcium Phosphate. *Journal of the American Ceramic Society*, 82(10), 2808–2812.
- Habibovic, P., Gbureck, U., Doillon, C., D, B., Van Blitterswijk, C., & Barralet, J. (2008). Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials*, 29(7), 944–953.
- Hench, L. L. (1991). Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7), 1487–1510.

- Hulbert, S. F., Morrison, S. J., & Klawitter, J. J. (1972). Tissue Reaction to Three Ceramics of Porous and Non-Porous Structures. *J. Biomed. Mater. Res.*, 6, 347–374.
- Ishikawa, K., Takagi, S., Chow, L. C., Ishikawa, Y., Eanes, E. D., & Asaoka, K. (1994). Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. *Dental Materials*, 10(1), 26–32.
- Jiménez, E. B. M. (2010). *Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico alfa*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Karande, T. S., Ong, J. L., & Agrawal, C. M. (2004). Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(12), 1728–1743.
- Khairoun, I., Boltong, M. G., Driessens, F. C. M., & Planell, J. a. (1998). Limited compliance of some apatitic calcium phosphate bone cements with clinical requirements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9(11), 667–671.
- Khairoun, I., Driessens, F. C., Boltong, M. G., Planell, J. a., & Wenz, R. (1999). Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 20(4), 393–398.
- Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907–2915.
- Labsynth. (2016). FISPQ - Fosfato de Sódio Bibásico Dodecahidratado.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260, 920–926.
- LeGeros, R., Daculsi, G., & LeGeros, J. (2008). Bioactive bioceramics. *Orthopedic Biology and Medicine: Musculoskeletal Tissue Regeneration*, 153–181.
- Lemaitre, J., Mirtchi, A., & Mortier, A. (1987). Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicates Industriels*, 52(9-10), 141–

- León, B., & Jansen, J. A. (2009). *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants* (1st ed.). New York: Springer Science.
- Liu, C., Chen, C.-W., & Ducheyne, P. (2008). In vitro surface reaction layer formation and dissolution of calcium phosphate cement-bioactive glass composites. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 3(September), 034111.
- Lyon, L. A. (2002). Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry. Volume 2 Edited by Krister Holmberg (Chalmers University of Technology). John Wiley & Sons: West Sussex. 2002. *Journal of the American Chemical Society*, 124(50), 15143–15144.
- Miao, X., Hu, Y., Liu, J., & Wong, A. P. (2004). Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements. *Materials Letters*, 58(3-4), 397–402.
- Monma, H., & Kanazawa, T. (1976). The hydration of α -tricalcium phosphate. *Yogyo-Kyokai-Shi*, 84, 209–213.
- Montufar, E. B., Traykova, T., Gil, C., Harr, I., Almirall, A., Aguirre, A., ... Ginebra, M. P. (2010). Foamed surfactant solution as a template for self-setting injectable hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 876–885.
- Montufar, E. B., Traykova, T., Planell, J. a., & Ginebra, M. P. (2011). Comparison of a low molecular weight and a macromolecular surfactant as foaming agents for injectable self setting hydroxyapatite foams: Polysorbate 80 versus gelatine. *Materials Science and Engineering C*, 31(7), 1498–1504.
- Montufar, E. B., Traykova, T., Schacht, E., Ambrosio, L., Santin, M., Planell, J. a., & Ginebra, M. P. (2010). Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatine foams for bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(3), 863–869.

- Morejón, L. (2011). *Avaliação de cimentos ósseos de Fosfatos de Cálcio com adições de Aluminato e Silicato de Cálcio*. UFRGS.
- Ni, J., & Wang, M. (2002). In vitro evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite. *Materials Science and Engineering C*, 20(1-2), 101–109.
- Park, J., & Lakes, R. S. (2007). *Biomaterials: An Introduction* (3rd ed.). New York: Springer Science.
- Porter, M. R. (1993). *Handbook of Surfactants*. New York: Springer Science.
- Prweb. (2011). US Bone Grafts Market to Reach US\$2.3 Billion by 2017, According to New Report by Global Industry Analysts, Inc. Retrieved April 14, 2015, from http://www.prweb.com/releases/bone_grafts/standard_bone_allografts/prweb8953883.htm
- Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., & Thomas, P. (2002). Calcium phosphate apatites with variable Ca / P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*, 23(3), 1065–1072.
- Rose, F. R. a J., & Oreffo, R. O. C. (2002). Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(1), 1–7.
- Safronova, T. V., Putlyaev, V. I., Avramenko, O. a., Shekhirev, M. a., & Veresov, a. G. (2011). Ca-deficient hydroxyapatite powder for producing tricalcium phosphate based ceramics. *Glass and Ceramics (English Translation of Steklo I Keramika)*, 68(1), 28–32.
- Salager, J.-L., Andérez, J. M., & Forgiarini, A. (2003). Influencia de la formulación sobre las espumas. *Cuaderno FIRP 263-A. Laboratorio de Formulación, Interfases Reología Y Procesos*, 1–15.
- Sarda, S., Nilsson, M., Balcells, M., & Fernández, E. (2003). Influence of surfactant

- molecules as air-entraining agent for bone cement macroporosity. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 65A, 215–221.
- Schramm, L. L. (2005). *Emulsions, Foams, and Suspensions. Fundamentals and Applications*. Weinheim: Wiley - VCH Verlag.
- Scientific, B. (2014). Critical Micelle Concentration. Retrieved from <http://www.biolinscientific.com/attension/applications/?card=AA8>
- Shepherd, J. H., & Best, S. M. (2011). Calcium phosphate scaffolds for bone repair. *JOM*, 63(4), 83–92.
- Shimazaki, K., & Mooney, V. (1985). Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. *Journal of Orthopaedic Research*, 3(3), 301–310.
- Simske, S. J., Ayers, R. a., & Bateman, T. a. (1997). Porous Materials for Bone Engineering. *Materials Science Forum*, 250(1), 151–182.
- Studart, A. R., Gonzenbach, U. T., Tervoort, E., & Gauckler, L. J. (2006). Processing routes to macroporous ceramics: A review. *Journal of the American Ceramic Society*, 89(6), 1771–1789.
- Tonyan, T. D., & Gibson, L. J. (1992). Structure and mechanics of cement foams. *Journal of Materials Science*, 27(23), 6371–6378.
- Unosson, J., Montufar, E. B., Engqvist, H., Ginebra, M.-P., & Persson, C. (2015). Brushite foams-the effect of Tween® 80 and Pluronic® F-127 on foam porosity and mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(1), 67–77.
- Valle, S. Del, Miño, N., Muñoz, F., González, A., Planell, J. a., & Ginebra, M. P. (2007). In vivo evaluation of an injectable Macroporous Calcium Phosphate Cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 353–361.

- Valletregi, M. (1997). Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite. *Solid State Ionics*, 101-103, 1279–1285.
- Volkmer, T. M., & Santos, L. A. (2007). Influência do tempo de polimerização nas propriedades de hidroxiapatita porosa obtida por gelcasting de espumas. *Cerâmica*, 53, 25–36.
- Wagoner Johnson, A. J., & Herschler, B. A. (2011). A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomaterialia*, 7(1), 16–30.
- Wilson, A. J. (1989). *Foams: Physics, Chemistry and Structure (Springer Series in Applied Biology)*. Springer Science.
- Xu, H. H. K., Takagi, S., Quinn, J. B., & Chow, L. C. (2004). Fast-setting calcium phosphate scaffolds with tailored macropore formation rates for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 68, 725–734.
- Xu, H. H. K., Weir, M. D., Burguera, E. F., & Fraser, A. M. (2006). Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials*, 27(24), 4279–4287.
- Yoshikawa, T., Suwa, Y., Ohgushi, H., Tamai, S., & Ichijima, K. (1996). Self-setting hydroxyapatite cement as a carrier for bone-forming cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 6(5), 345–351.
- Zhang, J., Liu, W., Gauthier, O., Sourice, S., Pilet, P., Rethore, G., ... Weiss, P. (2015). 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*, 31, 326–338.
- Zhang, J., Liu, W., Schnitzler, V., Tancret, F., & Bouler, J. M. (2014). Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, 10(3), 1035–1049.