

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

TIÊ MENEZES OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO DE TÉCNICAS PARA A FABRICAÇÃO DE *SCAFFOLDS*
BIOCERÂMICOS MACROPOROSOS PARA FINS BIOMÉDICOS.**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2020**

TIÊ MENEZES OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO DE TÉCNICAS PARA A FABRICAÇÃO DE *SCAFFOLDS*
BIOCERÂMICOS MACROPOROSOS PARA FINS BIOMÉDICOS.**

**Prospecting techniques for the manufacture of macroporous bioceramic
scaffolds for biomedical purposes**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Área de Concentração: Engenharia Biomédica.
Orientador: Prof. Dr. Lucas Freitas Berti.

CURITIBA

2020



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite o download e o compartilhamento da obra desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-la ou utilizá-la para fins comerciais.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba - Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica



TIE MENEZES OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO DE TÉCNICAS PARA A FABRICAÇÃO DE SCAFFOLDS
BIOCERÂMICOS MACROPOROSOS PARA FINS BIOMÉDICOS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Data de aprovação: 26 de Março de 2021

Banca Examinadora:

Prof.a Gislaine Bezerra Pinto Ferreira, Doutorado - Universidade Federal da Integração Latino-Americana (Unila)

Prof Marco Augusto Stimamiglio, Doutorado - Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

Prof Reginaldo Justino Ferreira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 26/03/2021.

Dedico esta dissertação a meus pais, irmão, e às diversas amizades que fiz em Curitiba durante o curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Lucas Freitas Berti, pelas orientações, conselhos, dicas e confiança nesta trajetória.

Aos meus pais, José Carlos e Cássia Maria, que, mesmo de longe, nunca deixaram de me apoiar e se preocupar durante o trabalho.

Ao meu irmão e amigo, Yan, pela força de sempre.

À um amigo que acabou virando irmão, Cristian Griebler, colega de mestrado que dividiu as angústias comigo e me deu forças para continuar. Não tenho palavras pra descrever o que sua amizade significa para mim.

Aos meus amigos de festivais que conheci durante o tempo em Curitiba. Todos eles, em especial à minha amiga Mônica, primeira amizade que fiz e que me apresentou muito do que levo comigo hoje.

Ao meu amigo André, que acabou se tornando mais um irmão, por quem eu tenho muita estima. Obrigado pela companhia, festas, cervejas, risadas e perrengues durante todo esse tempo.

À galera do Hostel Social, minha segunda família em Curitiba. Principalmente à Maria Helena, Kelen, Sthefani e Letícia Usanovich. Vocês fizeram esses quase três anos em Curitiba mais leves. Espero vê-las novamente em breve!

À minha querida amiga Maria, com quem dividi apartamento durante pouco mais de um ano. Obrigado por me ouvir desabafar sempre e pelas conversas nas horas de crises de ansiedade, te amo, sério.

Ao meu grande amigo Saul, pelas conversas, conselhos e cervejas.

À minha amiga Isabela, que eu nem sei o porquê de sermos amigos, mas ainda bem que somos.

“Insanidade é repetir os mesmos erros e esperar resultados diferentes”

Narcóticos Anônimos, 1981

RESUMO

OLIVEIRA, Tiê Menezes. **Prospecção de técnicas para a fabricação de *scaffolds* biocerâmicos macroporosos para fins biomédicos**. 2020. 75 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

A utilização de biomateriais na medicina tem se intensificado conforme novos tratamentos vão surgindo. Dentre os biomateriais, um segmento de grande importância que tem atraído a atenção de diversos cientistas são as biocerâmicas. Esses materiais possuem diversas aplicações quando se trata de regeneração, geração e formação de tecidos ósseos. O fosfato de cálcio, mais especificamente a hidroxiapatita, constitui uma grande parte da composição dos ossos e dentes humanos. Esse composto é facilmente produzido em laboratório com propriedades semelhantes às daquele natural presente no corpo humano. O biomaterial é utilizado principalmente para a produção de *scaffolds* porosos com o intuito de atuar como enxerto ósseo e substituir técnicas como o auto e aloenxerto. Este trabalho validou as principais técnicas de fabricação desses *scaffolds* usadas atualmente (*freeze casting*, impressão por extrusão, HAPES (suspensão emulsificada com alto teor de alcãno) e LAPES (suspensão emulsificada com baixo teor de alcãno), e estuda os parâmetros da técnica de produção de estruturas cerâmicas porosas chamada *direct foaming* – espumação direta – para tentar adaptar o processo para a produção de *scaffolds* de hidroxiapatita. Suspensões cerâmicas foram produzidas com auxílio de um agitador mecânico e um sonicador a fim de comparações nas dispersões produzidas, que tiveram suas propriedades reológicas analisadas em um reômetro rotacional. Os *scaffolds* produzidos foram observados por microscopia eletrônica de varredura para estudo da microestrutura. Resultados indicam que, apesar da técnica de espumação ser relativamente simples, com o uso de poucos reagentes químicos, trabalhar com materiais cerâmicos envolve diversas variáveis que precisam ser estudadas com cautela para que *scaffolds* sejam produzidos com parâmetros ideais para a aplicação em pesquisas médicas.

Palavras-chave: Biomateriais, Hidroxiapatita, Fosfato de Cálcio, Tecido Ósseo, *Scaffold*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Tiê Menezes. **Prospecting techniques for the manufacture of macroporous bioceramic scaffolds for biomedical purposes.** 2020. 75 f. Dissertation – Post-Graduation Program in Biomedical Engineering, Federal University of Technology - Paraná. Curitiba, 2020.

The use of biomaterials in medicine has intensified as new treatments are emerging. Among biomaterials, an important segment that has attracted the attention of several scientists are bioceramics. These materials have various applications when it comes to bone tissue regeneration, generation and formation. Calcium phosphates, more specifically, hydroxyapatite, forms a large percentage of the composition of human bones and teeth. This compound is easily produced in laboratory with properties similar to those found in the human body naturally. The biomaterial is used mainly for the production of porous scaffolds in order to act as a bone graft and substitute techniques such as auto and allograft. This work validates the main manufacturing techniques of these scaffolds that are currently used, and studies the parameters of the porous ceramic structures production technique called direct foaming and tries to adapt the process for the production of hydroxyapatite scaffolds. Ceramic suspensions were produced with the aid of a mechanical stirrer and a sonicator in order to compare the dispersions produced, which had their rheological properties analyzed in a rotational rheometer. The scaffolds produced were observed by scanning electron microscopy for the study of the microstructure. Results indicate that, although the foaming technique is relatively simple, using few chemical reagents, working with ceramic materials involves several variables that need to be studied carefully so that scaffolds are produced with ideal parameters for application in medical research.

Keywords: Biomaterials, Hydroxyapatite, Calcium Phosphate, Bone Tissue, Scaffold.

LISTA DE GRÁFICOS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DE UM PROCESSO DE DISPERSÃO DE PARTÍCULAS	18
FIGURA 2 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO À VÁCUO UTILIZANDO BOMBA E VIDRARIAS APROPRIADAS	38
FIGURA 3 – MASSA DE HIDROXIAPATITA OBTIDA NA REAÇÃO DE SÍNTESE	47
FIGURA 4 – SUSPENSÃO DE ALUMINA LIOFILIZADA	42
FIGURA 5 – PRIMEIRA TENTATIVA DE EXTRUSÃO DA PASTA A COM A) UMA CAMADA E B) DUAS CAMADAS	43
FIGURA 6 – TENTATIVA DE EXTRUSÃO DA PASTA B	44
FIGURA 7 – DETALHE DO PRODUTO OBTIDO PELA EXTRUSÃO DA PASTA B	44
FIGURA 8 – TENTATIVA DE FORMAÇÃO DO SCAFFOLD MACROPOROSO ATRAVÉS DA TÉCNICA HAPES	45
FIGURA 9 – EMULSÃO DE ALUMINA A) IMEDIATAMENTE APÓS O PROCESSO DE AGITAÇÃO MECÂNICA E B) EM FORMA DE SÓLIDO POROSO, RESULTADO DO PROCESSO DE ESPUMAÇÃO	46
FIGURA 10 SCAFFOLD PRODUZIDO COM HIDROXIAPATITA A) APÓS SECAGEM E B) APÓS SINTERIZAÇÃO	48
FIGURA 11 – PARTÍCULAS DE ALUMINA EM ESTRUTURA SÓLIDA SINTERIZADA	55
FIGURA 12 – IMAGENS DO SCAFFOLD TIRADAS COM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA USANDO AMPLIFICAÇÃO DE A) 600, B) 65, C) 43 E D) 40 VEZES.	56
FIGURA 13 – IMAGENS DO SCAFFOLD TIRADAS COM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA USANDO AMPLIFICAÇÃO DE A) 3000, B) 600, C) 60 E D) 50 VEZES.	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DE UM PROCESSO DE DISPERSÃO DE PARTÍCULAS	18
FIGURA 2 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO À VÁCUO UTILIZANDO BOMBA E VIDRARIAS APROPRIADAS	38
FIGURA 3 – MASSA DE HIDROXIAPATITA OBTIDA NA REAÇÃO DE SÍNTESE	47
FIGURA 4 – SUSPENSÃO DE ALUMINA LIOFILIZADA	42
FIGURA 5 – PRIMEIRA TENTATIVA DE EXTRUSÃO DA PASTA A COM A) UMA CAMADA E B) DUAS CAMADAS	43
FIGURA 6 – TENTATIVA DE EXTRUSÃO DA PASTA B	44
FIGURA 7 – DETALHE DO PRODUTO OBTIDO PELA EXTRUSÃO DA PASTA B	44
FIGURA 8 – TENTATIVA DE FORMAÇÃO DO SCAFFOLD MACROPOROSO ATRAVÉS DA TÉCNICA HAPES	45
FIGURA 9 – EMULSÃO DE ALUMINA A) IMEDIATAMENTE APÓS O PROCESSO DE AGITAÇÃO MECÂNICA E B) EM FORMA DE SÓLIDO POROSO, RESULTADO DO PROCESSO DE ESPUMAÇÃO	46
FIGURA 10 SCAFFOLD PRODUZIDO COM HIDROXIAPATITA A) APÓS SECAGEM E B) APÓS SINTERIZAÇÃO	48
FIGURA 11 – PARTÍCULAS DE ALUMINA EM ESTRUTURA SÓLIDA SINTERIZADA	55
FIGURA 12 – IMAGENS DO SCAFFOLD TIRADAS COM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA USANDO AMPLIFICAÇÃO DE A) 600, B) 65, C) 43 E D) 40 VEZES.	56
FIGURA 13 – IMAGENS DO SCAFFOLD TIRADAS COM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA USANDO AMPLIFICAÇÃO DE A) 3000, B) 600, C) 60 E D) 50 VEZES.	57

LISTA DE SIGLAS

3DP	Impressão 3D
AFP	Agente Formador de Poros
β -TCP	Beta-tricalcio Fosfato
BMP-2	<i>Bone Morphological Protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDDP	Cisplatina
COL	Colágeno
DIW	<i>Direct Ink Writing</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMP	<i>Di(ethylenediamineplatinum)medronate</i>
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
GF	<i>Growth Factor</i>
HAp	<i>Hydroxyapatite</i>
HAPES	<i>High Alcane Phase Emulsified Suspension</i>
hPDSC	<i>Human Placental Derived Stem Cell</i>
HPMC	Hipromelose
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
LAPES	<i>Low Alcane Phase Emulsified Suspension</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
RHB	Rodamina B
rhBMP-2	<i>Recombinant Human Bone Morphological Protein</i>
SLA	Estereolitografia
SLS	Sinterização a Laser Seletiva
vol%	Porcentagem Volumétrica
wt%	Porcentagem em Peso.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CONTEXTO	14
1.2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	BIOCERÂMICAS	16
2.2	OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA	17
2.3	DISPERSÕES CERÂMICAS	17
2.4	SÍNTESE DE <i>SCAFFOLDS</i> BIOCERÂMICOS	18
2.4.1	LIOFILIZAÇÃO	19
2.4.2	MANUFATURA ADITIVA (3D PRINTING)	20
2.4.3	ESPUMAÇÃO DIRETA	22
2.5	BIOCERÂMICAS POROSAS NA MEDICINA MODERNA	25
2.5.1	<i>SCAFFOLDS</i> COMO AUXILIADORES NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS	25
2.5.2	<i>SCAFFOLDS</i> COMO CARREADORES DE MOLÉCULAS	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	SELEÇÃO DE MATERIAIS	33
3.2	PRODUÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i> DE ALUMINA	34
3.2.1	PRODUÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> ATRAVÉS DA LIOFILIZAÇÃO	34
3.2.2	PRODUÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> POR IMPRESSÃO 3D DE EXTRUSÃO DE PASTA CERÂMICA	35
3.2.3	PRODUÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> ATRAVÉS DA ESPUMAÇÃO DIRETA	35
3.3	SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA	37
3.4	PRODUÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i> DE HIDROXIAPATITA	38
3.5	ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	39
3.5.1	RENDIMENTO DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITA	39
3.5.2	ANÁLISE REOLÓGICA DA SUSPENSÃO DE ALUMINA	39
3.5.3	ANÁLISE DA MICROESTRUTURA DA ESPUMA CERÂMICA	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1	AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA PRODUÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i> DE ALUMINA	41
4.1.1	LIOFILIZAÇÃO	41
4.1.2	MANUFATURA ADITIVA POR EXTRUSÃO DE PASTA CERÂMICA	43
4.1.3	ESPUMAÇÃO DIRETA PELO MÉTODO HAPES	45
4.1.4	ESPUMAÇÃO DIRETA PELO MÉTODO LAPES	45
4.2	PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITA	46
4.3	AVALIAÇÃO DA TÉCNICA LAPES PARA PRODUÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> DE HIDROXIAPATITA	48
4.4	REOLOGIA DAS SUSPENSÕES	48
4.4.1	DISPERSÕES DE ALUMINA REALIZADAS POR AGITAÇÃO MECÂNICA	49
4.4.2	DISPERSÕES DE ALUMINA REALIZADAS POR PROCESSADOR ULTRASSÔNICO	50
4.4.3	DISPERSÕES DE HIDROXIAPATITA DISPERSAS POR PROCESSO ULTRASSÔNICO	52

4.5	ANÁLISE DA MICROESTRUTURA DAS ESPUMAS CERÂMICAS	54
4.5.1	MICROESTRUTURA DO <i>SCAFFOLD</i> DE ALUMINA	54
4.5.2	MICROESTRUTURA DO <i>SCAFFOLD</i> DE HIDROXIAPATITA	56
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	58
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO

Existem diversas definições para o termo “biomaterial”. De acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, podemos definir o termo como: “Qualquer substância, ou combinação de substâncias, que não fármacos, de origem sintética ou natural, que pode ser usada por qualquer período de tempo, que melhora ou substitui parcialmente ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, de maneira a manter ou melhorar a qualidade de vida de um indivíduo” (WILLIAMS, 2011). É comum a confusão entre “biomaterial” e “material biológico”, sendo este último produzido por um sistema biológico, como órgãos e artérias.

Uma vasta gama de campos da ciência colabora para o desenvolvimento de novos biomateriais para uso médico e odontológico, dentre elas a biologia, a engenharia, a física, e a química (KULINETS, 2015).

O papel do biomaterial vem se atualizando conforme são desenvolvidos materiais com propriedades específicas para cada tipo de tratamento, como correção de anormalidades e medicina regenerativa, além da função estrutural e da produção de instrumentos cirúrgicos cada vez mais avançados (WONG, BRONZINO, 2007).

Dentre os variados tipos de biomateriais, se encontram as biocerâmicas – objeto de estudo deste trabalho.

Scaffolds porosos biocerâmicos hoje encontram espaço em duas principais linhas de pesquisa. São utilizados como carreadores, onde o material, juntamente com fármacos, células, fatores de crescimento, etc. são inseridos no local necessário de modo que a porosidade da estrutura atua como principal controle de liberação dessas substâncias, fazendo com que sejam alimentadas aos poucos ao sistema biológico *in loco* (GAIKWAD, PATIL, *et al.*, 2008). O uso desses *scaffolds* como enxerto ósseo sintético também é bastante estudado.

A coleta de autoenxerto, usualmente da crista ilíaca do paciente, é um procedimento custoso, que pode gerar riscos de infecção e hematomas, enquanto o aloenxerto é limitado pela possibilidade de uma resposta imunológica negativa devido

às diferenças genéticas, além do risco de induzir doenças transmissíveis, tornando o enxerto sintético uma opção promissora (EL-GHANNAM, 2005).

A hidroxiapatita (HAp) e o β – tricalcio fosfato (β -TCP), devido à excelente biocompatibilidade e propriedade de osteointegração, têm sido amplamente utilizados para reparar e reconstruir tecidos ósseos, especialmente como substitutos para preenchimento de defeitos ou fraturas, através de *scaffolds* porosos (MEURICE, LERICHE, *et al.*, 2012, ROSETI, PARISI, *et al.*, 2017).

1.2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novos procedimentos médicos significa maiores taxas de sucesso em tratamentos, cirurgias e diagnósticos. Os biomateriais cerâmicos estão na mira de pesquisadores que visam modernizar e aperfeiçoar a engenharia de tecidos rígidos, e de sistemas de carreamento de medicamentos.

A hidroxiapatita é uma biocerâmica de fácil obtenção, podendo ser explorada em estratégias onde o uso desse tipo de material se faz necessário.

Este trabalho tem como objetivos: (1) Revisar procedimentos de fabricação das estruturas porosas de HAp e compósitos, assim como aplicações desses *scaffolds* no meio biomédico, (2) validar procedimentos de fabricação das estruturas porosas utilizando alumina e hidroxiapatita, (3) sintetizar a hidroxiapatita através do método da precipitação úmida. (4) avaliar a possibilidade da manufatura do *scaffold* de hidroxiapatita através de técnicas de espumação direta, adaptando os processos realizados por Barg e colaboradores (BARG, MORAES, *et al.*, 2009, BARG, SOLTMANN, *et al.*, 2008).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo tem como objetivo apresentar a fundamentação teórica em seu estado da arte acerca da produção de *scaffolds* biocerâmicos, e sua aplicação na medicina moderna.

2.1 BIOCERÂMICAS

Materiais biocerâmicos como fosfatos de cálcio (dentre eles, a hidroxiapatita) são os maiores constituintes do osso humano – cerca de 60% em massa, e compõem aproximadamente 90% da massa dos dentes (ELIAZ, METOKI, *et al.*, 2017). O sistema biomecânico de um osso é bastante complexo e existem requerimentos específicos para que um material seja considerado ideal para o uso como substituinte. A biocompatibilidade de um *scaffold* ósseo está ligada principalmente à capacidade de osteointegração e as suas propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, mecânicas, porosidade e biorreabsorbilidade (BOSE, ROY, *et al.*, 2012).

A engenharia de tecidos ósseos tem como foco principalmente o estudo de *scaffolds*/próteses para a formação de novos tecidos. Os materiais comumente utilizados para estes fins são poliméricos, compósitos ou cerâmicos (BURG, PORTER, *et al.*, 2000).

As biocerâmicas foram inicialmente estudadas e utilizadas no campo da cirurgia ortopédica como uma alternativa a biomateriais metálicos (SHEIKH, NAJEEB, *et al.*, 2015). Atualmente, esses materiais são estudados essencialmente pelas suas atribuições em preenchimentos de defeitos ósseos, reparo de fraturas, substituição de tecidos ósseos danificados, sistemas de carregamento de moléculas (*drug delivery*) e encobrimento de implantes (ELIAZ, METOKI, *et al.*, 2017, NAYAK, 2010). Algumas das desvantagens do uso das biocerâmicas são a fragilidade, alta dureza e baixa resistência a fraturas (AHMED, PARSONS, *et al.*, 2012).

A hidroxiapatita – foco deste trabalho, é um fosfato de cálcio bioativo e biorreabsorvível que possui uma razão atômica estequiométrica entre cálcio e fosfato de 1,67 (SOPYAN, SINGH, *et al.*, 2008). Embora a HAp sintética e a natural se diferenciem em alguns aspectos físicos, as semelhanças químicas garantem seu

potencial de osteointegração (ERBE, MARX, *et al.*, 2001, GHOSH, NANDI, *et al.*, 2008).

2.2 OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA

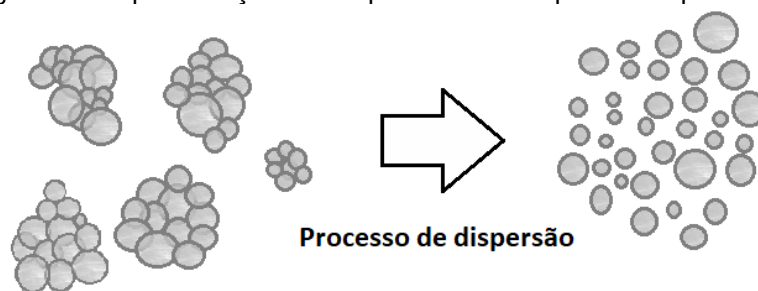
Existem diversas maneiras de se obter a hidroxiapatita, podendo ser citados os métodos sol-gel, hidrotérmico, por precipitação, por processamento da HAp natural, entre outros (AGRAWAL, SINGH, *et al.*, 2011, LOMBARDI, PALMERO, *et al.*, 2011, MANAFI, JOUGHEHDOUST, 2009, SANTOS, OLIVEIRA, *et al.*, 2004). O procedimento mais comum e vastamente utilizado de síntese da hidroxiapatita é o da precipitação em meio aquoso, devido ao bom rendimento e ao fato de não utilizar nenhum tipo de solvente orgânico (NAYAK, 2010).

2.3 DISPERSÕES CERÂMICAS

Em contato com líquidos, os sólidos particulados são mantidos juntos por forças de atração de diferentes naturezas, química ou física, incluindo tensão superficial do líquido e forças de Wan Der Waals. Para o preparo de dispersões estáveis, essas forças precisam ser vencidas para que o material se desaglomere e forme uma suspensão homogênea. A aplicação de forças mecânicas tem o potencial de destruir os aglomerados que se formam. Dentre os métodos utilizados para o preparo de dispersões, encontram-se a agitação mecânica e o processamento por ultrassom. A agitação a altas rotações é comumente utilizada para o preparo de dispersões (KINGERY, BOWEN, *et al.*, 1976).

O processo de dispersão ultrassônica é relacionado com o fenômeno da cavitação, que envolve três etapas: (1) formação de bolhas de ar, (2) crescimento e (3) implosão da bolha. As bolhas, ao colapsarem, geram ondas de energia de alta pressão que são responsáveis pela quebra de aglomerados sólidos (CHRISTENSEN, 1992).

Figura 1 – Representação de um processo de dispersão de partículas



Fonte: Autoria própria (2018)

Dentre os parâmetros a serem estudados na produção de *scaffolds*, podemos citar a quantidade de sólidos na suspensão cerâmica como um dos principais para que o processo ocorra perfeitamente. Isso porque esse valor influencia diretamente nas propriedades reológicas da suspensão, tendo relação com a formação de poros.

2.4 SÍNTESE DE *SCAFFOLDS* BIOCERÂMICOS

De modo a obter características semelhantes ao tecido ósseo natural humano, diversos estudos têm sido feitos acerca da construção de *scaffolds* que imitem a composição deste. Compósitos como HAp/colágeno, HAp/quitosana, HAp/gelatina (CHANG, TANAKA, 2002, KIM, Hae Won, KNOWLES, *et al.*, 2005, YAMAGUCHI, TOKUCHI, *et al.*, 2001), entre outros, que combinam as propriedades de componentes orgânicos e inorgânicos do osso se fazem necessários para maior eficiência desses suportes.

Existem diversas maneiras de produzir *scaffolds* a partir de compósitos contendo hidroxiapatita, ou até fabricados usando a HAp pura. Dentre todas as maneiras, as mais encontradas na literatura são os métodos de liofilização, manufatura aditiva (Impressão 3D), sol-gel e espumação direta. Nesta seção, serão revisados alguns trabalhos recentes onde pesquisadores buscaram sintetizar esses *scaffolds* com fins biomédicos, utilizando os meios mais comuns de produção.

2.4.1 Liofilização

O primeiro trabalho a apresentar resultados acerca da preparação de cerâmicas porosas utilizando o processo de liofilização data do ano 2000 (FUKASAWA, ANDO, *et al.*, 2001). Desde então, pesquisadores vêm se concentrado em buscar opções para utilizar como agente formador de poros (AFP) no processo. A estrutura do poro em uma cerâmica é determinada pelo AFP, *i.e.*, pela morfologia do cristal do solvente líquido (CHENG, YANG, *et al.*, 2018).

Semyari *et al.* prepararam *scaffolds* de colágeno/ η HAp preenchidos com doxiciclina – um medicamento antibacteriano – utilizando liofilização, com uma mistura de água e etanol como AFP (SEMYARI, SALEHI, *et al.*, 2018). A intenção era usar o *scaffold* como carreador para administração *in situ* da droga. Análises estruturais no *scaffold* produzido foram realizadas, e a capacidade de auxiliar no tratamento de defeitos ósseos em ratos também foi avaliada. Os autores verificaram resultados satisfatórios nos ensaios estruturais do *scaffold*, e em testes *in vivo*, tendo o defeito ósseo submetido ao tratamento com a peça de colágeno/ η HAp/doxiciclina sido completamente regenerado e substituído por novos tecidos conjuntivos.

Em 2016, Ghorbani e colaboradores, utilizando um compósito de HAp/gelatina, fabricaram um *scaffold* macroporoso, e incorporaram a este microesferas de PLGA preenchidas com dexametasona – um medicamento com ações anti-inflamatórias e imunossupressoras (GHORBANI, NOJEHDEHIAN, *et al.*, 2016). A pesquisa avaliou as propriedades mecânicas e físico-químicas da peça, e chegou a importantes conclusões. Maiores concentrações de HAp em relação ao polímero causaram uma diminuição no tamanho de poro médio do *scaffold*, na taxa de biodegradação e liberação da droga. Uma melhora na resistência à compressão também foi notada. Sobre o processo de liofilização, Ghorbani e colaboradores observaram que um aumento na taxa de resfriamento reduziu o tamanho médio do poro, enquanto aumentou a dilatação (inchaço) da peça, a taxa de biodegradação, e também a taxa de liberação do medicamento.

Na Coreia, Lee *et al.* produziram *scaffolds* porosos de hidroxiapatita com porosidade gradual, a partir de um processo de liofilização sequencial, para fins biomédicos (LEE, Hyun, JANG, *et al.*, 2017). Poros de tamanhos variados em

scaffolds são importantes por mimetizar aquela do osso humano. Esse gradiente funciona de modo que regiões com alta porosidade facilitam o transporte de fluidos corporais e adesão celular, causando uma melhora a regeneração óssea, enquanto a parte mais densa do *scaffold* garante uma melhor resistência a cargas mecânicas (FU, Qiang, RAHAMAN, *et al.*, 2008, HOLMES, HAGLER, 1988). A porosidade no *scaffold* foi controlada pela concentração de HAp na suspensão, e o solvente/AFP foi o canfeno. Testes de compressão e de biocompatibilidade, com cultivo de pré-osteoblastos foram efetuados após a liofilização e posterior sinterização da peça. Averiguaram que a variação da concentração de hidroxiapatita e a proporção entre as partes densas e porosas poderiam controlar as forças de compressão e a porosidade média do *scaffold*. Nos testes com pré-osteoblastos, o cultivo ocorreu com sucesso, com as células se proliferando pela peça, com aumento de viabilidade celular depois de três e cinco dias de cultivo.

2.4.2 Manufatura Aditiva (3D Printing)

Entre as diversas alternativas para a construção dos *scaffolds* cerâmicos para fins biomédicos, temos a impressão 3D (3DP) como um caminho extremamente promissor. Este método permite o design (a partir de softwares avançados) e a fabricação de *scaffolds* com microarquiteturas complexas e precisas, além de um melhor controle de tamanho de poro, geometria e interconectividade (ZHANG, YANG, *et al.*, 2019).

Dentre as variadas tecnologias de manufatura aditiva utilizadas para a fabricação de *scaffolds* (como estereolitografia (SLA) (LEE, Kee Won, WANG, *et al.*, 2007), sinterização a laser seletiva (SLS) (SHUAI, ZHUANG, *et al.*, 2013), fabricação por filamento fundido (FFF/FDM) (OLADAPO, ZAHEDI, *et al.*, 2019), robocasting (DIW), etc.) esta revisão manterá o foco neste último processo – baseado na extrusão do material – por ser um dos mais investigados devido à suas vantagens na manipulação de biomateriais (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, CABAÑAS, *et al.*, 2015, ROOPAVATH, Malferrari, *et al.*, 2019, SEARS, DHAVALIKAR, *et al.*, 2017).

Para a manufatura aditiva de cerâmicas, pode ser utilizada uma metodologia que utiliza a extrusão uma pasta de impressão com viscosidade apropriada para o processo. A pasta é composta pela cerâmica em si, misturada homogeneamente com aditivos, que é então dispensada através de um bico extrusor camada a camada (ROOPAVATH, MALFERRARI, *et al.*, 2019).

Para a impressão de cerâmicas, existem diversos parâmetros a serem considerados, podendo ser citados a distribuição e tamanho da partícula, composição do aglutinante, viscosidade e velocidade de extrusão (TROMBETTA, INZANA, *et al.*, 2017). Diâmetros de partícula esféricas entre 20 μm e 100 μm produziram bons resultados na impressão (INZANA, OLVERA, *et al.*, 2014, RAJA, YUN, 2016). Para reduzir o risco de obstrução do bico de extrusão é necessário o cuidado de o tamanho da partícula não se aproxime do diâmetro do mesmo. Segundo Roopavath *et al.*, a viscosidade da pasta não deve ser muito pequena, pois dificulta a formação de camadas, enquanto altas viscosidades requerem extrusões com pressões elevadas, e podem, também, entupir o bico de impressão. O aglutinante tem a função de ajustar essa viscosidade, além de ajudar a agrupar as partículas cerâmicas durante a impressão, para que a estrutura impressa mantenha-se estável e possa suportar a camada seguinte (ROOPAVATH, MALFERRARI, *et al.*, 2019).

Roopavath e colaboradores estudaram extensivamente parâmetros da impressão tridimensional de cerâmicas, de modo a otimizar o processo de extrusão para a criação de designs complexos de *scaffolds* ósseos (ROOPAVATH, MALFERRARI, *et al.*, 2019). Para a preparação da pasta de impressão, utilizaram HAp em pó, com diâmetro médio de partícula de 25 μm e hipromelose (HPMC) como aglutinante, adicionando 4 g de HAp a 2 g de solução de HPMC 1,5 wt%. A modelagem computadorizada do *scaffold* cúbico (10 x 10 x 7 mm) foi feita no software CAD e convertida para um arquivo de extensão “.stl” utilizando o aplicativo Slic3r™. Três modelos foram projetados para preenchimentos de 50, 75 e 100%. Após a impressão, os *scaffolds* foram secos a 120 °C em um forno à vácuo, e então sinterizados à 1350 °C. O objetivo do estudo foi demonstrar a possibilidade de confeccionar, com precisão, uma peça anatomicamente semelhante a um defeito ósseo específico de um paciente utilizando procedimentos relativamente simples, com o auxílio de modelagem tridimensional a partir de tomografias computadorizadas.

Li *et. al.* avaliaram os efeitos osteogênicos de *scaffolds* impressos a partir de hidroxiapatita/colágeno em hBMSCs (LI, LEI, *et al.*, 2019). Nano HAp juntamente com a proteína foram utilizados para preparar a pasta de impressão de maneira elementar. Colágeno de tendão bovino foi disperso em ácido acético ($0,05 \text{ mol.mL}^{-1}$) na concentração de 30 g.L^{-1} . Após, η HAp foi adicionada à solução da proteína com agitação constante (45 rpm) durante 12 h à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A concentração final de HAp na pasta foi de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$. Foram impressos *scaffolds* de dimensões $15 \times 15 \times 5 \text{ mm}$, em que o espaçamento entre linhas de impressão foi de 1,5 mm. Os *scaffolds* impressos ainda passaram por processos de liofilização. Diversas análises para caracterização do *scaffold* foram realizadas, onde foi detectado uma estrutura regular com poros bem distribuídos, e hidroxiapatita homogeneamente dispersa na fase de colágeno. Para a análise de biocompatibilidade do *scaffold*, o mesmo foi semeado com 100 μL de suspensão de células e submerso em um meio de cultivo (DMEM) *in vitro*. Os testes confirmaram a adesão e proliferação das células no *scaffold*, assim como a diferenciação destas em osteoblastos.

A fim de estudar os efeitos da sinterização de biocerâmicas via micro-ondas, Wu *et. al.* realizaram testes mecânicos e de biocompatibilidade em *scaffolds* de hidroxiapatita fabricados por meio de impressão 3D (WU, ZHANG, *et al.*, 2013). Foram produzidos *scaffolds* cúbicos a partir da extrusão de uma pasta de impressão contendo η HAp (30% em volume), poliacrilato de amônio como dispersante e hipromelose como espessante. 1-Octanol e glicerina foram ainda adicionados para prevenir a formação de espumas, e como umectante, respectivamente. Após a sinterização, os *scaffolds* foram avaliados quanto a sua microestrutura, degradação *in vitro*, esforço de compressão, composição de fases e propriedades biológicas. Os testes mecânicos de compressão atingiram uma média de 45.57 Mpa (contra 20.70 MPa em *scaffolds* tratados de maneira convencional), tomando como parâmetros os *scaffolds* sinterizados da maneira tradicional, enquanto o teste de biocompatibilidade *in vitro* com cultivo de células MC3T3-E1 demonstrou uma boa adesão, espalhamento e crescimento na superfície da estrutura.

2.4.3 Espumação Direta

A espumação direta de cerâmicas é uma técnica vastamente utilizada para a criação de *scaffolds* porosos a partir de diversos tipos de materiais (BHASKAR, PARK, *et al.*, 2016, COLONETTI, SANCHES, *et al.*, 2018, GREGOROVÁ, PABST, *et al.*, 2016, JANA, SUNDARARAJAN, *et al.*, 2017, SARKAR, LEE, *et al.*, 2016), com várias aplicações na ciência. Este método, que está entre os mais simples e polivalentes das técnicas de produção de cerâmicas porosas, comumente utiliza bolhas de ar incorporadas a suspensões como agente formador de poros, embora outros tipos de substâncias, como alcanos, possam ser utilizados para este propósito (BARG, MORAES, *et al.*, 2009, BARG, SOLTMANN, *et al.*, 2008). A espuma é então estabilizada com agentes químicos, secada e sinterizada. Segundo Studart e equipe, a porosidade da espuma está ligada diretamente à quantidade de ar incorporada à suspensão, enquanto o tamanho de poro depende da estabilidade da espuma (STUDART, GONZENBACH, *et al.*, 2006). Ainda de acordo com Studart, estruturas celulares produzidas através desta técnica, no lugar de procedimentos que utilizam moldes normalmente atingem uma maior resistência mecânica.

Wang et al. fabricaram *scaffolds* macroporosos de hidroxiapatita através de espumação direta para aplicações em engenharia de tecidos ósseos (WANG, Xiang, LI, *et al.*, 2016). A equipe conseguiu uma estrutura homogênea, com alta porosidade, interconectividade dos poros, resistência mecânica e excelente relação área superficial superfície/volume total – parâmetros essenciais para avaliações de *scaffolds* fabricados para finalidades biomédicas. Para o preparo da suspensão, foi utilizada η HAp comercial (25% em volume na solução) e água deionizada com 0,5% em peso do sal de amônio de ácido poliacrílico. O pH da suspensão foi mantido em 11,0 com auxílio de amônia e ácido clorídrico. À suspensão, foi adicionado propil galato (1,5% em relação à massa de HAp) dissolvido em etanol para garantir a estabilidade da espuma, e então octano (200% em volume) foi incorporado como AFP. A emulsão foi obtida através de agitação com um mixer e posteriormente deixada para secar à temperatura ambiente, antes de ser sinterizada por 3h a temperaturas entre 1100 °C e 1400 °C.

Em outro estudo, para o cultivo *in vitro* de células de células hepáticas primárias, Finoli et al. produziram *scaffolds* de hidroxiapatita altamente porosos através do processo de espumação direta, utilizando heptano como formador de poros (FINOLI, OSTROWSKI, *et al.*, 2012). Para a formação da suspensão, os

pesquisadores usaram HAp (30% em peso na solução) água deionizada e polimetilmetacrilato de amônio como dispersante. Ácido clorídrico foi adicionado para ajuste de pH, uma vez que surfactantes catiônicos são favorecidos em meio ácido para a estabilização das bolhas na emulsão. A suspensão foi agitada em um mixer a 2500 rpm por 20 minutos, e após homogeneizada, cloreto de benzetônio foi incorporado à suspensão como surfactante, juntamente com heptano em diversas frações de volume, para a obtenção de diferentes porosidades. Para a formação da emulsão, a mistura foi agitada durante 2 minutos em alta velocidade. O resultado obtido foi vertido em um molde de papel e colocado por 1 h em um dissecador a 24 °C e 60% de umidade relativa, e então deixado durante a noite com uma umidade relativa de 40% para secagem. Após essa etapa, os moldes foram postos em um forno a 900 °C para queima do papel, e em seguida, aquecidos até os 1300 °C para sinterização da espuma, temperatura esta que foi mantida por 5 h. Os pesquisadores concluíram, através de análises morfológicas nos *scaffolds*, que o aumento da quantidade de heptano (AFP) diminuiu a quantidade de poros ao mesmo tempo que aumentou o diâmetro destes, causando também uma amplificação na espessura da parede entre os poros.

Em Faenza, cidade italiana tida como referência em produção de cerâmicas, Dapporto e colaboradores estudaram um novo processo de espumação direta, com a incorporação de bolhas de ar na suspensão HAp sendo realizada por um moinho de bolas de alta energia (DAPPORTO, SPRIO, *et al.*, 2016). Para a produção dos *scaffolds*, a suspensão cerâmica foi obtida misturando-se hidroxiapatita pré-sinterizada, água e Dolapix CA (Zschimmer and Schwartz, Alemanha), como dispersante, na proporção mássica 73%, 23% e 4% respectivamente. Um moinho de bolas foi utilizado para homogeneizar a suspensão em um recipiente de zircônia de 250 mL contendo 6 esferas de zircônio (15 mm de diâmetro). O equipamento funcionou com uma rotação de 400 rpm por 30 minutos. Em seguida, Olimpicon A (Olimpia Tensioattivi, Itália) e W53 (Zschimmer and Schwartz, Alemanha) foram adicionados à suspensão como agentes formadores de espuma, e a mistura foi agitada no moinho por 5 minutos a 400 rpm novamente. Para fins analíticos, 3 grupos de *scaffolds* com diferentes quantidades de ar incorporado foram produzidos. O resultado obtido na segunda agitação foi deixado para secar em temperatura ambiente por 2 dias, e então tratados termicamente em temperaturas de até 1250 °C. Como

resultados, as estruturas apresentaram tamanho de poros médio entre 1,8 μm e 2,0 μm e porosidades entre $6,03 \pm 0,8\%$ e $85,2 \pm 0,5\%$.

2.5 BIOCERÂMICAS POROSAS NA MEDICINA MODERNA

Scaffolds biocerâmicos são utilizados na medicina de diversas maneiras, para variados tipos de tratamento. Além de suportar células, é possível encontrar diversos trabalhos fazendo estudos sobre o uso de *scaffolds* de como sistemas de carregamento de moléculas – a liberação controlada de substâncias como remédios e fatores de crescimento (GF) da cerâmica para o organismo, em sítios específicos.

2.5.1 *Scaffolds* Como Auxiliadores na Regeneração de Defeitos Ósseos

Daugela et al. estudaram *in vitro* e *in vivo* o uso de *scaffolds* de celulose/ η HAp e celulose/ μ HAp na engenharia de tecidos ósseos, em comparação com um controle – um aloenxerto disponível comercialmente (DAUGELA, PRANSKUNAS, *et al.*, 2018). Os *scaffolds* foram produzidos através do processo de liofilização e apresentaram estrutura porosa altamente interconectada, com diâmetro médio de poro de $490 \pm 94 \mu\text{m}$ e $540 \pm 132 \mu\text{m}$ para nano e micro hidroxapatita, respectivamente. Para a caracterização *in vitro*, foram cultivados osteoblastos nos *scaffolds*, com a finalidade de avaliar a adesão celular e atividade metabólica, além da atividade da fosfatase alcalina e expressão genética dos osteoblastos. A investigação *in vivo* analisou a biocompatibilidade dos *scaffolds* em um defeito calvário em um coelho. De acordo com os autores do trabalho, a interação inicial do sistema biológico e o material externo provém da camada de proteínas que é adsorvida pela superfície do biomaterial. A superioridade na resposta biológica da η HAp se mostrou presente no estudo *in vivo*, de modo que uma maior quantidade de novo tecido mineralizado se formou neste *scaffold*, em comparação com os *scaffolds* formados pela μ HAp e pelo controle. Além disso, o implante de μ HAp é associado à uma maior ativação de resposta imuno-inflamatória, comparado com a η HAp (BOTA, COLLIE, *et al.*, 2010). O estudo conclui que o compósito celulose/ η HAp é promissor para uso na área de

engenharia de tecidos, substituindo auto e aloenxertos – métodos mais utilizados atualmente.

A hidroxiapatita possui uma superfície relativamente hidrofílica, o que favorece a deposição de proteínas, e garante a bioatividade das moléculas adsorvidas, favorecendo a adesão e espalhamento celular (WILSON, CLEGG, *et al.*, 2005).

A estrutura dos *scaffolds* feitos a partir de η HAp e μ HAp, com poros interconectados é essencial para o metabolismo celular e remoção de dejetos (POLO-CORRALES L, LATORRE-ESTEVEES M, 2014). Essas conexões ajudam a formação de novos tecidos e auxiliam o processo anabólico das células (CAUSA, NETTI, *et al.*, 2007). *Scaffolds* produzidos com a η HAp apresentam uma maior área superficial em relação à μ HAp, influenciando positivamente na proliferação e adesão celular, além de favorecer a neovascularização do material (POLO-CORRALES L, LATORRE-ESTEVEES M, 2014).

Ainda sobre variáveis que afetam as características biológicas e físico-químicas dos *scaffolds*, pode ser citado o tamanho do poro, que influencia diretamente a adesão celular e formação de tecidos vascularizados. Diâmetros entre 200 μ m e 600 μ m se mostram favoráveis à promoção de osteogênese e angiogênese, contribuindo na formação de tecidos ósseos *in vivo* (LOH, CHOONG, 2013).

Johari e colaboradores estudaram a regeneração de falhas calvarias de tamanhos críticos em ratos utilizando *scaffolds* de HAp/gelatina preenchidos com células semelhantes a osteoblastos (osteo) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs). A gelatina é um derivado do colágeno e garante características favoráveis ao *scaffold*, como biocompatibilidade, e adesão celular, além de não provocar respostas imunológicas no corpo humano, fazendo deste um polímero atrativo para ser combinado com a hidroxiapatita (JOHARI, AHMADZADEHZARAJABAD, *et al.*, 2016). A adição de gelatina à HAp tende a melhorar a atividade da enzima fosfatase alcalina, proliferação celular, osteogênese, e aprimora as propriedades mecânicas do *scaffold* (KIM, Hae Won, KNOWLES, *et al.*, 2005). Os pesquisadores usaram quatro grupos de amostras, sendo eles: um branco, um grupo com *scaffolds* vazios, um com *scaffolds* preenchidos com os dois tipos de células (osteo/HUVECs) e outro preenchido apenas com células osteo. De acordo com análises histomorfométricas, os três últimos grupos tiveram evolução

significativamente maior que o grupo em branco, e o grupo com melhor formação óssea foi o que teve o defeito ósseo preenchido com o *scaffold* e os dois tipos de célula.

Liu e colaboradores investigaram a capacidade de *scaffolds* de hidroxiapatita/colágeno (cHAp) e hidroxiapatita/colágeno com ligação cruzada (cl-cHAp) preenchidos com células tronco mesenquimais (BMSC) regenerarem defeitos periodontais em cães da raça beagle (LIU, YIN, *et al.*, 2016). Propriedades das células tronco como adesão, proliferação, migração, e morfologia foram analisadas *in vitro* no co-cultivo com os *scaffolds*. Os *scaffolds* foram produzidos através do processo de liofilização e apresentaram tamanho de poro médio de $415 \pm 20 \mu\text{m}$ (cHAp) e $203 \pm 18 \mu\text{m}$ (cl-CHAp) com porosidade de $69 \pm 5\%$ e $50 \pm 2\%$, respectivamente. Os pesquisadores conseguiram observar, *in vitro*, que as BMSCs aderiram firmemente à estrutura tridimensional de ambos os suportes e se espalharam uniformemente pela mesma. Os cientistas usaram seis animais, onde cada um deles passou por um procedimento placebo, e três defeitos cirúrgicos, de forma que, dentre esses defeitos, um não recebeu o implante do *scaffold* (para avaliação da regeneração natural), enquanto os outros dois receberam *scaffolds* com e sem células tronco, respectivamente. Microtomografia computadorizada, coloração HE, coloração de Masson e avaliação histológica foram os procedimentos utilizados para examinar a eficiência do tratamento. Foi detectado um aumento considerável de regeneração periodontal, identificado pela formação de novos tecidos ósseos, ligamento periodontal e cimento, nos defeitos que receberam os *scaffolds* para o tratamento, confirmando a eficácia do método.

Ainda na área de *scaffolds* feitos a partir de compósitos de cerâmicas com polímeros naturais, Ning et al. estudaram a fabricação e a eficácia no suporte celular desses *scaffolds* à base de colágeno e hidroxiapatita. Os suportes foram preenchidos com células tronco mesenquimais (BMSCs) e células-tronco de ligamento periodontal (hPDSCs) de ratos e humanos, respectivamente, para a regeneração óssea *in vitro* (REN, SECONDARY, *et al.*, [S.d.]). O trabalho teve como objetivo a produção do compósito colágeno/HAp através de mineralização controlada, e avaliar suas propriedades biológicas quando combinadas com as BMSCs e as hPDSCs. Foram sintetizados *scaffolds* com diferentes proporções Col:HAp. O cultivo das células nos suportes com composição 80:20 e 50:50 indicaram boa biocompatibilidade e poder de

adesão celular do compósito, sugerindo um forte potencial para uso na regeneração óssea.

2.5.2 *Scaffolds* Como Carreadores de Moléculas

O uso de moléculas biologicamente ativas para aprimorar a eficácia em tratamentos utilizando *scaffolds* na engenharia de tecidos é vastamente estudado (ROMAGNOLI, ASTA, *et al.*, 2013). A recuperação de feridas e tecidos danificados se dá por meio de sinalizações biológicas. Fatores de crescimento fazem parte desse grupo de sinais que, não só aprimoram a restauração de tecidos danificados, como induzem a formação de novos tecidos (SCHLIEPHAKE, 2015).

Existem diversos estudos que avaliam parâmetros dos *scaffolds* de HAp e suas influências sobre a taxa de liberação das moléculas. Dentre estes parâmetros, podem ser citados a porosidade, o tamanho e a distribuição dos poros, a área superficial específica, microestrutura do compósito, e os mecanismos de interação entre o medicamento e a estrutura cerâmica (BOHNER, M., VAN LENTHE, *et al.*, 2005, BOHNER, Marc, LEMAÎTRE, *et al.*, 2000, OTSUKA, NAKAHIGASHI, *et al.*, 1998).

Moléculas aprisionadas em um material poroso tendem a desprender-se por um processo de difusão através dos poros até se libertar no meio onde está disperso o *scaffold* (LEMAIRE, BÉLAIR, *et al.*, 2003). Fica evidente, portanto, que um maior tamanho de poro, ou maior porosidade do *scaffold* facilite o desprendimento desta molécula.

Um menor tamanho de poro causa uma diminuição na taxa de liberação do medicamento devido à dois fatores importantes: a difusão mais lenta, provocada pela redução do gradiente de concentração das moléculas, e a possibilidade da obstrução do poro (LOPEZ, ORTIZ, *et al.*, 2010).

Ślósarczyk *et al.* utilizaram *scaffolds* de hidroxiapatita preenchidos com pentoxifilina para estudar a cinética de liberação da droga *in vitro* (ŚLÓSARCZYK, SZYMURA-OLEKSIK, *et al.*, 2000). Utilizaram uma mistura de cerâmica e farinha como agente de sacrifício para formação de poros e sinterizaram a mistura, obtendo tamanho de poro entre 0,1 μm e 15 μm , e porosidade de 23 – 44%. A equipe monitorou

a taxa de difusão do fármaco, concluindo que esta era controlada pela porosidade do carreador.

Afim de estudar a microestrutura da hidroxiapatita como parâmetro modificador da taxa de liberação de drogas, Barroug et al. sintetizaram 3 tipos da cerâmica – uma delas altamente cristalizada, uma cristalizada de maneira deficitária e outra carbonatada para testes *in vitro* (BARROUG, KUHN, *et al.*, 2004). Com os experimentos, os pesquisadores chegaram à conclusão que, uma maior cristalinidade da HAp não apenas influencia de maneira proporcional a velocidade de liberação de drogas, como também afeta a capacidade de adsorção da partícula, sendo esta mais eficaz em materiais menos cristalinos. O fenômeno pode ser explicado pela maior quantidade de defeitos na estrutura da superfície, proporcionando maior formação de sítios de adsorção. A temperatura também influenciou de modo proporcional a adsorção da molécula.

Como citado previamente, a interação entre a droga e o *scaffold* é um parâmetro importante com forte influência na dessorção da molécula armazenada. Palazzo *et al* puderam confirmar isso ao carregar CDDP e DMP (drogas baseadas em elementos metálicos) em duas amostras de hidroxiapatita nano-cristalinas, sendo uma delas com morfologia tipo lamela e a outra do tipo acicular, afim de estudar a cinética de dessorção de ambas (PALAZZO, IAFISCO, *et al.*, 2007).

A proteína morfogenética óssea – 2 (BMP-2) é um fator de crescimento primário e fundamental para a regeneração de tecidos ósseos, uma vez que possui a propriedade de induzir células tronco multipotentes a se diferenciarem em linhagens osteogênicas (WANG, Elizabeth A, ROSEN, *et al.*, 1990).

Quinlan e colaboradores realizaram um trabalho no qual observaram o efeito de *scaffolds* de colágeno/hidroxiapatita (cHAp) preenchidos com a proteína humana recombinante morfogenética óssea 2 (rhBMP-2), e a liberação controlada desta, na regeneração de tecidos ósseos superiores (QUINLAN, THOMPSON, *et al.*, 2015). A equipe usou como justificativa para o projeto o fato de que a liberação não controlada da BMP-2 causa diversos tipos de complicações em pacientes, como ossificação heterotópica, definida pela formação de osso em tecidos que não possuem a propriedade de ossificação - como músculos (SOUZA, AQUINO, *et al.*, 2017), osteólise, aumento de defeitos neurológicos e até câncer (EPSTEIN, 2011, 2013,

TANNOURY, AN, 2014). Os pesquisadores criaram um *scaffold* altamente poroso a partir do compósito cHAp, utilizando um processo de liofilização, para suportar a liberação controlada das BMP-2 durante 21 dias *in vitro*. O sistema teve sua bioatividade confirmada pelo aumento gradual da atividade da enzima fosfatase alcalina, além da produção de cálcio por pré-osteoblastos cultivados no *scaffold*. Os *scaffolds* com a rhBMP-2 também foram avaliados *in vivo*, ao serem implantados em defeitos cranianos em ratos. Análises mostraram uma melhora significativa na regeneração dos defeitos 8 semanas após o implante, se comparado com o defeito em branco (sem *scaffold*), e o defeito onde foi inserido o *scaffold* sem a proteína morfogenética. Microtomografias computadorizadas evidenciaram que a formação de novos tecidos ósseos nos defeitos tratados com *scaffolds*/rhBMP-2 foi de cerca de 10 e 20 vezes maior que nos casos tratados com *scaffolds* sem proteína, e não tratados, respectivamente.

Sun et al. produziram *scaffolds* de nano-hidroxiapatita (η HAp) por meio de manufatura aditiva e incorporaram a estes um peptídeo derivado das BMP-2 para avaliar o potencial de uso desses suportes no auxílio na regeneração óssea em falhas cranianas de tamanho crítico em ratos (SUN, ZHOU, *et al.*, 2018). Os pesquisadores utilizaram a η HAp para a realização deste trabalho, pois esta estimula melhores respostas celulares em comparação à hidroxiapatita de tamanho micro, o que causa um melhoramento nas propriedades superficiais para o uso como substituintes de tecidos ósseos (KIM, Kyobum, DEAN, *et al.*, 2011). Utilizando um processo de extrusão com microsseringas, foram produzidos *scaffolds* cilíndricos com dimensões (diâmetro x altura): 5 mm x 2 mm, para os testes *in vivo* e 3 mm x 14 mm e 2 mm x 5 mm para os experimentos *in vitro*. Os suportes foram deixados para secar à temperatura ambiente por 24h, pré-sinterizados a 400 °C por 1 h, e então sinterizados a temperaturas de 1000 °C à 1400 °C por 2 h, até finalmente serem esterilizados com etanol 70% por 1 h. Para adicionar o peptídeo ao *scaffold*, 3 mg deste foram dissolvidos em 50 μ l de água deionizada, gotejado no suporte em condições estéreis, e posteriormente levado a um forno de secagem à vácuo em uma temperatura de -55 °C por 48 h. O estudo *in vitro* avaliou a cinética de liberação dos peptídeos dos *scaffolds* em um meio de cultivo, onde foi imerso, com coletas periódicas do fluido para contagem das biomoléculas. Para a avaliação *in vivo* dos *scaffolds*, foram estudados seus efeitos contendo o peptídeo em questão, BMP-2, ou vazios, na

regeneração de defeitos ósseos em ratos. Foram realizados diagnósticos utilizando microtomografia computadorizada e análises histológicas e histomorfológicas. A equipe, por fim, concluiu que os *scaffolds* tratados à 1000 °C obtiveram a microestrutura superficial mais efetiva comparado à outras temperaturas de sinterização, favorecendo a liberação controlada do peptídeo. A adição do peptídeo estudado aprimorou a biocompatibilidade do suporte e a regeneração do defeito ósseo.

Os *scaffolds* cerâmicos também vêm sendo estudados em diferentes geometrias. Xiong et al. estudaram o efeito de microesferas porosas ocas de hidroxiapatita preenchidas com BMP-2 na regeneração óssea de grandes defeitos em ratos (XIONG, ZENG, *et al.*, 2015). O estudo teve como objetivo analisar a liberação controlada da proteína em função do tempo, e examinar a recuperação do tecido danificado induzida pelas esferas. Foram comparados 3 casos: o implante de microesferas com a proteína, microesferas vazias, e o uso da proteína sem o biocerâmico. As microesferas foram produzidas através de um processo de conversão de biovidro, com $100 \pm 25 \mu\text{m}$ de diâmetro, $60 \pm 8 \mu\text{m}$ de núcleo oco e $180 \pm 42 \text{ m}^2/\text{g}$ de área superficial. rhBMP-2 foi adicionado às esferas na proporção de 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Esses elementos carreadores foram recentemente desenvolvidos para um melhor controle e duração da liberação de substâncias bioativas (proteínas ou remédios) (FU, Hailuo, RAHAMAN, *et al.*, 2011, 2013), causados pela alta área superficial e liberação da matéria por dessorção através dos mesoporos de sua superfície (FU, Hailuo, RAHAMAN, *et al.*, 2011). A pesquisa mostrou que existiu liberação da proteína por mais de 40 dias, quando as microesferas foram encubadas em PBS, em um estudo *in vitro*. Houve um maior gradiente de liberação nas primeiras 48 h – o que é normalmente útil para a indução da formação de tecidos (CARRAGEE, HURWITZ, *et al.*, 2011, PERRI, COOPER, *et al.*, 2007). A análise *in vivo* indicou um potencial de regeneração óssea das microesferas cerâmicas com BMP-2 nas cobaias consideravelmente maior que os outros dois casos analisados.

Chen e colaboradores manufaturaram *scaffolds* porosos a partir de um compósito de HAp, gelatina e hialuronato através de 3D-Bioprinting (CHEN, Shangsi, SHI, *et al.*, 2019). O objetivo do estudo foi analisar a taxa de liberação de dois tipos de drogas – Rodamina B (RHB) e albumina de soro bovino (BSA) – em *scaffolds* bioimpressos e revestidos com hialuronato de sódio e quitosana. A pesquisa foi feita

in vitro e autores notaram uma redução na taxa de degradação do *scaffold*, enquanto o esforço de compressão aumentou significativamente devido ao revestimento. Com a investigação da taxa de liberação das drogas, foi possível notar um desprendimento gradual sustentado. O cultivo celular se mostrou efetivo, com o *scaffold* sendo apropriado para adesão e proliferação de células MC-3T3E1, confirmando a biocompatibilidade do compósito.

A hidroxiapatita tem sido estudada extensivamente para avaliação de seu potencial no auxílio em tratamentos de câncer, atuando como carreador de drogas anti-carcinogênicas (SABER-SAMANDARI, NEZAFATI, *et al.*, 2016). Uma das principais intervenções utilizadas em casos de tumores malignos é a quimioterapia, que tem como uma forte desvantagem a liberação instantânea de grande parte da droga no momento da administração. Isso causa um pico de concentração nos instantes iniciais, seguido de um rápido declínio, o que é desfavorável ao tratamento (HRYNIUK, FIGUEREDO, *et al.*, 1987).

O desprendimento gradual de remédios através de *scaffolds* biocerâmicos é uma alternativa que pode amenizar essa desvantagem. Estudos almejam uma liberação prolongada de remédios em locais específicos, de modo a garantir uma concentração em níveis ótimos *in loco* por períodos maiores, evitando assim, efeitos colaterais indesejáveis (BAJPAI, BENGHUZZI, 1988, BETSIOU, BANTSIS, *et al.*, 2012, BUCKLES, 1983).

A integração de fármacos com *scaffolds* biocompatíveis produzidos a partir de biopolímeros e biocerâmicas tem se mostrado uma boa maneira de reduzir a toxicidade sistêmica, ao mesmo tempo que aumenta a solubilidade da droga, e reduz o acúmulo de células tumorais em regiões específicas (BURGOS, BELCHIOR, *et al.*, 2002, ITOKAZU, SUGIYAMA, *et al.*, 1998, KUNIEDA, SEKI, *et al.*, 1993, MIKHAIL, ALLEN, 2009). Compósitos com HAp estão entre os mais utilizados em terapias de carreadores particulados para tipos diversos de câncer, como o de fígado (BAUER, LI, *et al.*, 2008, KUNDU, GHOSH, *et al.*, 2013), mama (MEENA, KESARI, *et al.*, 2012, PATHI, LIN, *et al.*, 2011), próstata (LUO, LING, *et al.*, 2010) e ósseo (ANDRONESCU, FICAI, *et al.*, 2010).

O carreador produzido a partir da HAp pura possui alguns pontos fracos, fazendo com que seu uso seja limitado. Destes pontos, podem ser citados a baixa

solubilidade em água (BACH, RAFIQUUL ISLAM, *et al.*, 2013, KOJIMA, WATANABE, *et al.*, 2013, WATANABE, NISHIO, *et al.*, 2013), pequena força coesiva e mecânica (LETIC-GAVRILOVIC, PIATTELLI, *et al.*, 2003), baixa taxa de degradação no corpo humano (BACH, RAFIQUUL ISLAM, *et al.*, 2013, CHEN, Jianhong, LUO, *et al.*, 2011), e a liberação precipitada do fármaco antes da chegada ao ponto de interesse (LI, LIU, *et al.*, 2012). Para amenizar essas questões, outros materiais são comumente misturados à hidroxiapatita afim de se obter compósitos com propriedades mecânicas e biológicas superiores (BACH, RAFIQUUL ISLAM, *et al.*, 2013, KOJIMA, WATANABE, *et al.*, 2013).

Novamente, biopolímeros são boas opções de uso para se conseguir essas melhorias. Quitosana, alginato, ciclodextrina, colágeno, gelatina, sulfato de condroitina, e seda (CHAI, ABDELKARIM, *et al.*, 2014, DOU, ZHU, *et al.*, 2011, GUO, SHI, *et al.*, 2014, HAYDEN, VOLLRATH, *et al.*, 2014, LIANG, LIU, *et al.*, 2012, VENKATESAN, PUVVADA, *et al.*, 2011) estão entre os polímeros naturais que já foram misturados com a HAp e testados – *in vivo*, ou *in vitro* – como carreadores de drogas anticancerígenas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção dissertará de forma detalhada sobre os insumos utilizados para a realização das experiências e análises deste trabalho.

3.1 SELEÇÃO DE MATERIAIS

Para a produção dos *scaffolds* de alumina, α -alumina (SG 1000, 0,6 μm , Alcoa), água deionizada e dispersante – um polieletrólito disponível comercialmente como Dolapix CE 64 (Zschimmer & Schwarz), foram agitados afim de criar uma suspensão estável. Hexano P.A. [C_6H_{14}] (Êxodo Científica), Heptano P.A. [C_7H_{16}] (Êxodo Científica) e Decano P.A. [$\text{C}_{10}\text{H}_{22}$] (Sigma Aldrich) foram utilizados como fase orgânica

e uma solução de lauril sulfato de sódio $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OSO}_3\text{Na}]$ (Sigma-Aldrich) (30 wt%) atuou como surfactante aniônico.

Para a síntese da hidroxiapatita, foram utilizados nitrato de cálcio tetra-hidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (Êxodo Científica), fosfato de amônio bibásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ (Êxodo Científica) e hidróxido de amônio P.A. $[\text{NH}_4\text{OH}]$ (Sigma-Aldrich).

Para a fabricação dos *scaffolds* de hidroxiapatita, foram utilizados a HAp sintetizada, água deionizada, Dolapix CE 64 (Zschimmer & Schwarz), e hidróxido de amônio (Sigma-Aldrich) para ajuste de pH, na etapa do preparo da suspensão. Para a formação da emulsão, hexano P.A. $[\text{C}_6\text{H}_{14}]$ (Êxodo Científica) foi utilizado como fase orgânica, e uma solução de lauril sulfato de sódio (Sigma-Aldrich) (30 wt%) atuou como surfactante aniônico.

Para o preparo das dispersões, foram utilizados dois equipamentos com ações distintas: um agitador mecânico Dispermat® AE03 (VMA-Getzmann, Alemanha) e um processador ultrassônico Vibra Cell™ VCX 750 (Sonics, EUA).

A análise da reologia das suspensões cerâmicas foi feita utilizando o reômetro rotacional RST-SST Touch™ (AMETEK Brookfield, EUA).

Microscopia eletrônica de varredura (Jeol JSM 6010PLUS-LA) foi utilizado, com o apoio do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná), para o estudo da microestrutura dos *scaffolds* de alumina, enquanto os *scaffolds* de hidroxiapatita foram analisados na própria UTFPR.

3.2 PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS DE ALUMINA

Nesta seção serão descritas as três metodologias utilizadas para a fabricação dos *scaffolds*.

3.2.1 Produção de *Scaffolds* Através da Liofilização

Para testar o procedimento de liofilização, uma suspensão aquosa foi preparada com 45 vol% de alumina, e 1 wt% de polietilenoglicol (em relação à massa

de alumina) e vertida em copos plásticos, que serviram como moldes. A suspensão foi então congelada à -18 °C até completa solidificação do sistema. O sólido foi levado ao liofilizador por 48 horas para sublimação. Após secagem, a sinterização é realizada em um forno (Nabertherm, HTC 03/16, Alemanha) à 1540 °C com rampa de aquecimento de 5 °C/min e resfriamento de 5 °C/min.

3.2.2 Produção de *Scaffolds* por Impressão 3D de Extrusão de Pasta Cerâmica

Para a impressão do *scaffold*, uma pasta foi produzida segundo Barg e colaboradores (BARG, MORAES, *et al.*, 2009). A suspensão emulsificada com alta concentração de alcano consiste em uma suspensão cerâmica emulsificada com uma fase alcano em concentrações de 70 vol%. A diferença no processo foi a adição de diferentes porcentagens de polietilenoglicol (1 wt% e 3 wt% em relação ao peso da alumina) como plastificante, com a intenção de atingir propriedades reológicas apropriadas, necessárias para o processo de impressão em camadas. Os *scaffolds* foram projetados em forma de prisma com base de dimensões 50 x 50 mm.

3.2.3 Produção de *Scaffolds* Através da Espumação Direta

Os *scaffolds* macroporosos foram produzidos seguindo as rotas propostas por Barg e colaboradores (BARG, MORAES, *et al.*, 2009, BARG, SOLTMANN, *et al.*, 2008). A fabricação do *scaffold* envolve quatro etapas: a produção de uma suspensão cerâmica estabilizada (I), preparo da emulsão contendo a suspensão cerâmica e uma fase orgânica formadora de poros (II), espumação (III) e secagem/sinterização (IV).

3.2.3.1 O método HAPES (emulsificação com alta concentração de alcano)

Para a produção da suspensão, alumina em pó (42 vol%) foi adicionada lentamente à água deionizada contendo 0,75 wt% (em relação ao peso de alumina)

de dispersante. A mistura foi agitada durante 20 minutos com rotação de 2000 rpm. Posteriormente, a suspensão foi novamente agitada sob pressão reduzida por 2 minutos para remoção de bolhas de ar incorporadas ao sistema. A emulsão é preparada adicionando-se o surfactante aniônico (3 gotas) e a fase líquida orgânica, decano P.A. (70,0 vol%), à suspensão cerâmica. A mistura foi agitada por 2,5 minutos com uma rotação de 2500 rpm. O Procedimento é realizado sob pressão reduzida para evitar a incorporação de ar na emulsão. Ambos os processos foram realizados com o auxílio de um Dispermat AE03 (VMA Getzmann GmbH). Para a espumação, a emulsão foi vertida em placas de Petri de plástico com 1, mm de altura x 50 mm de diâmetro, e deixada para secar ao ar livre para posterior sinterização. A sinterização é realizada em um forno (Nabertherm, HTC 03/16, Alemanha) à 1540°C com rampa de aquecimento de 5 °C/min e resfriamento de 5 °C/min.

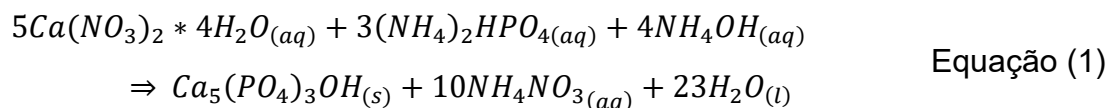
3.2.3.2 O método LAPES (emulsificação com baixa concentração de alcano)

Para a produção da suspensão, alumina em pó (42 vol%) foi adicionada lentamente à água deionizada contendo 0,75 wt% (em relação ao peso de sólido) de dispersante. A mistura foi agitada durante 20 minutos com rotação de 2000 rpm. Posteriormente, a suspensão foi novamente agitada sob pressão reduzida por 2 minutos para remoção de bolhas de ar incorporadas ao sistema. A emulsão é preparada adicionando-se o surfactante aniônico (0,33 vol%) e a fase líquida orgânica, hexano P.A. (5,5 vol%), à suspensão cerâmica. A mistura foi agitada por 2,5 minutos com uma rotação de 2500 rpm. O Procedimento é realizado sob pressão reduzida para evitar a incorporação de ar na emulsão. Ambos os processos foram realizados com o auxílio de um Dispermat AE03 (VMA Getzmann GmbH). Para a espumação, a emulsão foi vertida em placas de Petri de plástico com 15 mm de altura x 50 mm de diâmetro, recobertos com papel manteiga e imediatamente transferida para uma câmara climática a 23 °C e 45% de umidade relativa, onde o processo de expansão da emulsão acontece por 3 horas. Após a etapa de espumação, a placa com a espuma ainda úmida é deixada para secar ao ar livre. A sinterização é realizada em um forno (Nabertherm, HTC 03/16, Alemanha) à 1540°C com rampa de aquecimento de 5 °C/min e resfriamento de 5 °C/min.

3.3 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

A produção da hidroxiapatita foi feita por meio de precipitação aquosa de acordo com o livro “Biomaterials” (WONG, BRONZINO, 2007). Foram preparadas duas soluções: uma delas contendo 78,8 gramas de nitrato de cálcio tetra-hidratado $[Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O]$ dissolvidos em 250 mL de água deionizada, que posteriormente teve seu pH ajustado para 11 com hidróxido de amônio $[NH_4OH]$ PA. A Solução foi então diluída até atingir 400 mL. Para a segunda solução, 26,4 g de fosfato de amônio dibásico $[(NH_4)_2HPO_4]$ foram dissolvidos em 250 mL de água deionizada. O pH da solução resultante foi igualmente elevado até 11 utilizando $[NH_4OH]$ PA. Água deionizada foi utilizada para que o volume atingisse 400 mL. As soluções foram tituladas sob aquecimento e agitação constante com o auxílio de um agitador magnético.

A reação de formação da hidroxiapatita pode ser descrita pela equação:



O sólido precipitado foi filtrado à vácuo com posterior ressuspensão e filtração, para remoção de impurezas. Após a filtração, a hidroxiapatita foi levada à estufa a 60° C por 48 h para secagem. O produto então foi triturado e sinterizado a 1140 °C por 1h em um forno elétrico. O material sinterizado foi então peneirado em uma peneira granulométrica INOX ASTM 200 mesh. A Figura 2 mostra o esquema de filtração a vácuo, utilizado para recolher a hidroxiapatita sintetizada.

Figura 2 – Sistema de filtração à vácuo utilizando bomba e vidrarias apropriadas



Fonte: Autoria própria (2018)

3.4 PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS DE HIDROXIAPATITA

Para a produção da suspensão, hidroxiapatita em pó (42 vol%) foi adicionada lentamente à água deionizada contendo 0,75 wt% (em relação ao peso de sólido) de dispersante. Durante a adição da hidroxiapatita, o pH da solução foi ajustado em torno de 11, onde o potencial zeta da solução é fortemente negativo (BARG, MORAES, *et al.*, 2009, BARG, SOLTMANN, *et al.*, 2008). De forma a melhor dispersar a suspensão cerâmica, a dispersão da HAp foi realizada com o auxílio de um processador ultrassônico Vibra Cell™ VCX 750 (Sonics, EUA). A emulsão é preparada adicionando-se o surfactante aniônico (3 gotas) e a fase orgânica, hexano P.A. (5,5 vol%), à suspensão cerâmica. A mistura foi agitada por 2,5 minutos com uma rotação de 2500 rpm. O Procedimento é realizado sob pressão reduzida para evitar a incorporação de ar na emulsão. O processo de emulsão foi realizado com o auxílio de um Dispermat LC (VMA Getzmann GmbH). Para a espumação, a emulsão foi vertida em placas de Petri de plástico com 15 mm de altura x 50 mm de diâmetro recobertos com papel manteiga e imediatamente transferida para uma câmara climática a 23 °C e 45% de umidade relativa, onde o processo de expansão da emulsão acontece por

3 horas. Após a etapa de espumação, a placa com a espuma ainda úmida é deixada para secar ao ar livre. A sinterização é realizada em um forno à 1140 °C com rampa de aquecimento de 5 °C/min e resfriamento de 5 °C/min.

3.5 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

As análises realizadas neste trabalho visam: (1) validar a reação de formação da hidroxiapatita, através de análises gravimétricas, (2) estudar as propriedades reológicas das suspensões de alumina e hidroxiapatita e (3) investigar as propriedades da espuma cerâmica formada.

3.5.1 Rendimento da Reação de Produção de Hidroxiapatita

O produto da reação de formação da hidroxiapatita, após sinterização, foi pesado para análise gravimétrica quantitativa e avaliação do rendimento da reação.

3.5.2 Análise Reológica da Suspensão de Alumina

Uma vez que o objetivo deste trabalho é adaptar o método de produção de espumas cerâmicas proposto por Barg e colaboradores (BARG, SOLTMANN, *et al.*, 2008), foi feita uma análise reológica a fim determinar a concentração ótima de sólidos na suspensão de hidroxiapatita, de modo que a viscosidade da mesma seja semelhante à utilizada para a fabricação de espumas de alumina. A dispersão de alumina foi realizada por agitação mecânica com um Dispermat LC (VMA Getzmann GmbH) e também pelo processador ultrassônico, a fim de comparações.

As propriedades reológicas das dispersões com diferentes quantidades de sólido foram avaliadas em um reômetro rotacional RST-SST Touch™ (AMETEK Brookfield, EUA).

3.5.3 Análise da Microestrutura da Espuma Cerâmica

A análise da micro estrutura da espuma foi realizada através de um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, modelo EVO MA 15 – UTFPR) e (Jeol, JSM 6010PLUS-LA – Instituto Carlos Chagas - ICC). As amostras foram recobertas com ouro. A geometria de poro e das janelas de interconexão foram avaliados, por serem parâmetros de grande relevância na construção do *scaffold*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo apresenta os resultados obtidos na reação de síntese da hidroxiapatita, na fabricação dos *scaffolds* e no estudo reológico das suspensões de alumina e hidroxiapatita, além de discussões sobre os mesmos.

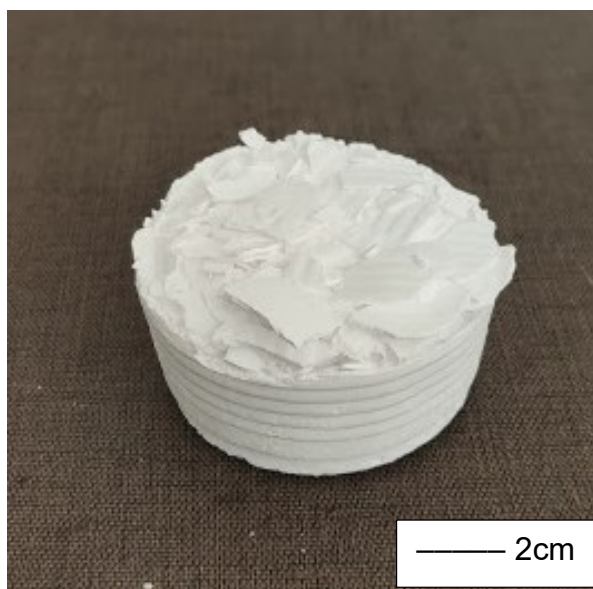
4.1 AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS DE ALUMINA

Nesta seção, serão avaliados os procedimentos de fabricação dos *scaffolds* macroporosos de alumina.

4.1.1 Liofilização

O processo de liofilização produziu amostras com estruturas densas, que não são apropriadas para os fins de produção de *scaffolds* Figura 3.

Figura 3 – Suspensão de alumina liofilizada



Fonte: Autoria própria (2019)

Diante do resultado, foi procurado na literatura sobre o porquê não foi possível alcançar estruturas celulares/lamelares/dendríticas, que são características do processo de congelamento. O trabalho de Zeng e colaboradores, mostra que existe uma combinação de gradiente de temperatura e velocidade de frente de congelamento, que produz estruturas celulares e estruturas dendríticas (ZENG, ARAI, *et al.*, 2019). Para controlar a frente de congelamento e o gradiente de temperatura, Miller e colaboradores propuseram, em dois trabalhos, um aparato caseiro simples de ser feito, composta de uma placa de material condutor, um recipiente para contenção da suspensão cerâmica, isolamento térmico e instrumentação com termopares (MILLER, XIAO, *et al.*, 2015, 2018). Além disso, Naviroj e colaboradores mostraram que é possível obter estruturas com valores de porosidade maior que 70% com morfologias variando desde estruturas celulares, passando por estruturas lamelares e podendo desenvolver estruturas dendríticas, pela variação do meio líquidos utilizado (NAVIROJ, VOORHEES, *et al.*, 2017). Em outro trabalho de Naviroj e colaboradores, os autores também mostram que é possível controlar o tamanho e formado dos cristais de gelo pelo controle de nucleação, utilizando um *template* que filtra direções de crescimento do gelo, favorecendo o crescimento em uma determinada direção (NAVIROJ, WANG, *et al.*, 2017).

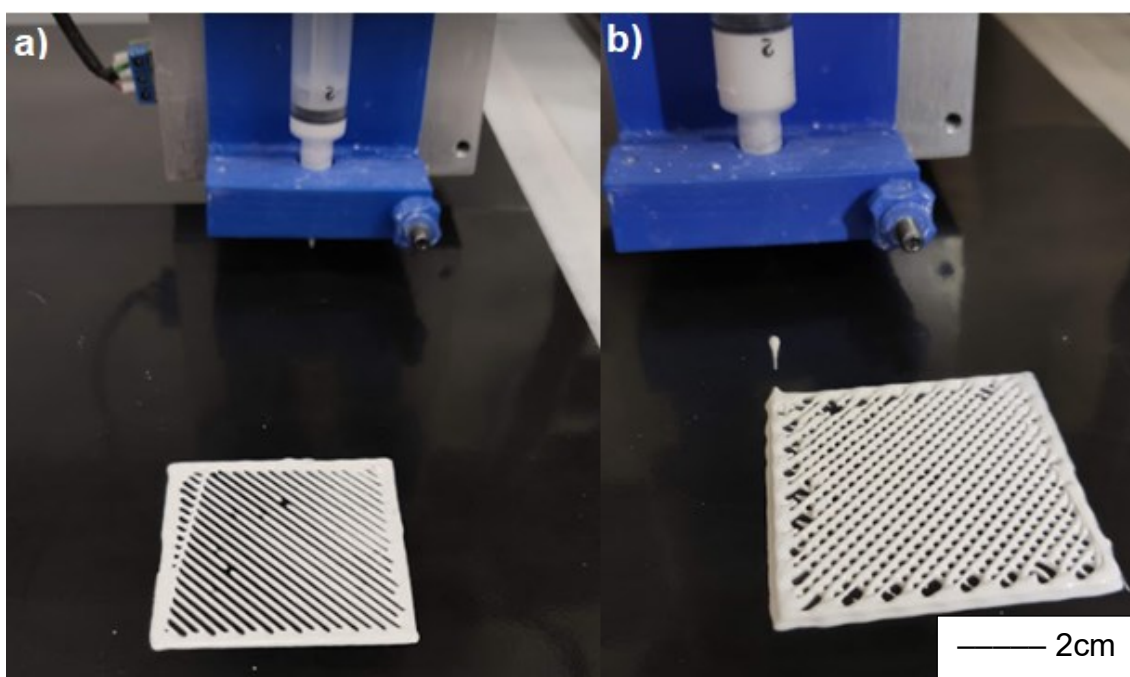
Para o avanço nessa linha, é necessária a adequação laboratorial, de modo a construir um aparato similar ao proposto por Zeng e colaboradores, e variar o meio

líquido da suspensão de modo a obter porosidade e tamanho de poros desejados no produto final. Na atual situação do trabalho, foi decidido partir para as demais técnicas disponíveis, deixando para trabalhos futuros a produção de scaffolds pelo processo de liofilização.

4.1.2 Manufatura Aditiva por Extrusão de Pasta Cerâmica

Na tentativa de extrusão, a primeira pasta (A) (1 wt% de polietilenoglicol) resultou em um material possível de extrudar, mas sua viscosidade não apresentou propriedades visco-elásticas compatíveis com a aplicação, uma vez que após a extrusão (impressão) o filamento apresentou deformação e escoou, não mantendo a forma. A Figura 4 apresenta a primeira tentativa de impressão por extrusão de pasta cerâmica.

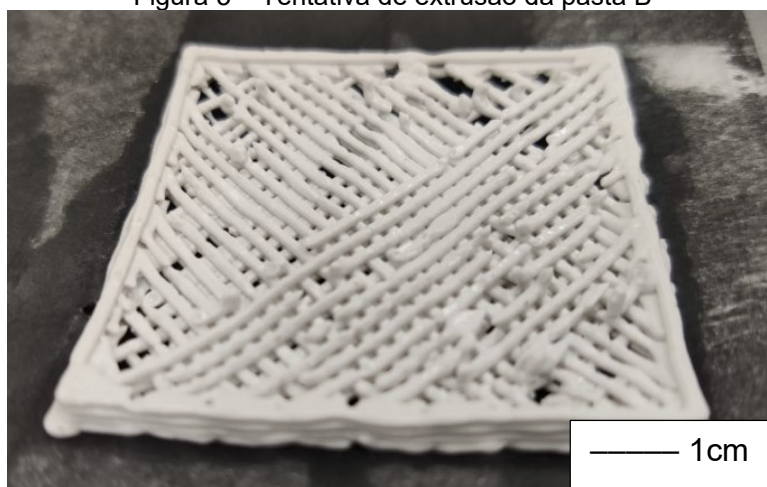
Figura 4 – Primeira tentativa de extrusão da pasta A com a) uma camada e b) duas camadas



Fonte: Autoria própria (2019)

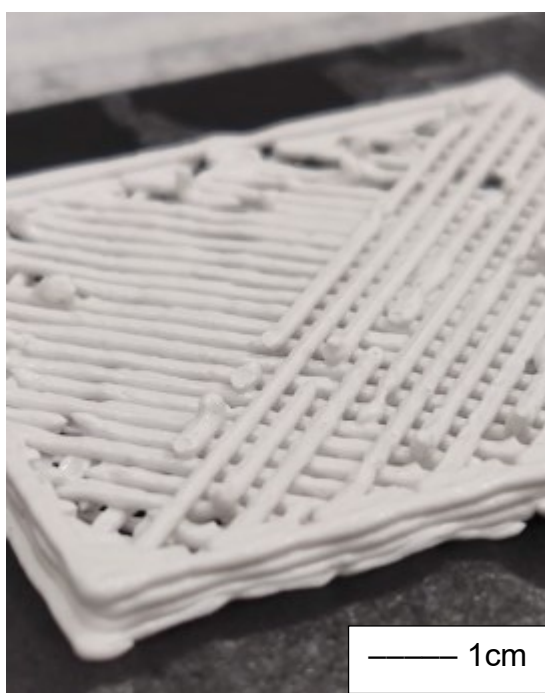
A pasta B (3 wt% etilenoglicol), apresentou melhor comportamento viscoelástico, mas ainda aquém do necessário para manter a forma. Os resultados da extrusão utilizando esta pasta estão apresentados nas Figura 5 e Figura 6.

Figura 5 – Tentativa de extrusão da pasta B



Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 6 – Detalhe do produto obtido pela extrusão da pasta B



Fonte: Autoria própria (2019)

Diante da situação foi necessária a busca por um aditivo para melhorar a estabilidade pasta cerâmica. Esse aditivo foi encontrado na literatura, que é a sílica pirolítica, ou em inglês “fumed sílica” (FRANCHIN, WAHL, *et al.*, 2017). Ela pode ser

encontrada com o nome comercial Aerosil – 200 e Aerosil – 380. Em estudos futuros, suspensões com esses aditivos serão avaliados para impressão.

4.1.3 Espumação Direta Pelo Método HAPES

A produção de *scaffolds* pela técnica HAPES, de acordo com Barg e equipe (BARG, MORAES, *et al.*, 2009), não resultou em uma estrutura com porosidade e tamanhos de poros desejados, embora a técnica tenha sido testada com os mesmos parâmetros e reagentes sugeridos pelos autores, além da tentativa com diversos alcanos (Heptano, Octano e Decano) (Figura 7).

Figura 7 – Tentativa de formação do *scaffold* macroporoso através da técnica HAPES



Fonte: Autoria própria (2019)

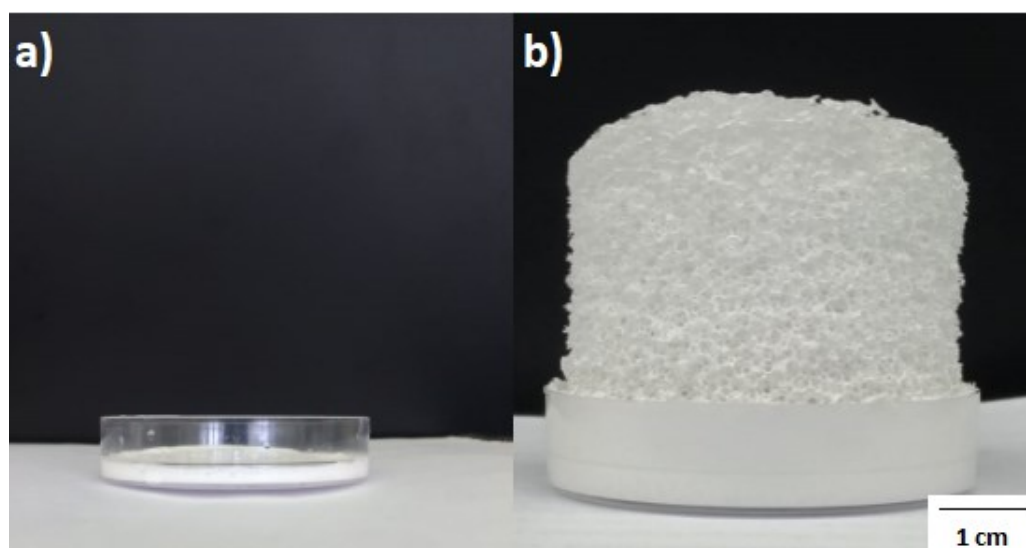
Diante disso, foi decidido tomar um segundo caminho, também baseado no processo de espumação (BARG, SOLTMANN, *et al.*, 2008).

4.1.4 Espumação Direta Pelo Método LAPES

A produção de *scaffolds* de alumina pela técnica LAPES produziu uma estrutura com porosidade e tamanhos de poros desejados. No processo de espumação, a emulsão expandiu seu tamanho inicial em cerca de 11 vezes, devido ao arraste por evaporação do alcano, deixando poros (espaços vazios). A Figura 8a mostra a

emulsão composta pela suspensão de alumina, surfactante e hexano, momentos antes de se iniciar o processo de espumação na câmara térmica, enquanto a Figura 8b exibe a estrutura porosa já seca, após 3 horas em estufa com temperatura e umidade relativa controladas e 48 h de secagem ao ar livre. A partir dessa técnica, serão apresentados, nas seções seguintes, resultados sobre os *scaffolds* obtidos.

Figura 8 – Emulsão de alumina a) imediatamente após o processo de agitação mecânica e b) em forma de sólido poroso, resultado do processo de espumação



Fonte: Autoria própria (2019)

4.2 PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITA

Após secagem e sinterização, o produto final da reação de síntese da HAp foi pesado em uma balança de precisão. A Figura 9 indica a massa total do produto.

Figura 9 – Massa de hidroxiapatita obtida na reação de síntese



Fonte: Autoria própria (2019)

Para o cálculo do rendimento da reação, uma simples conta de regra de três pode ser efetuada, tomando como base a estequiometria da reação e a massa teórica.

Considerando um rendimento teórico de 100%, pela estequiometria da reação, são necessários 396 gramas de fosfato de amônio para a produção de 502 gramas de hidroxiapatita. Na reação, foram utilizados 26,4 gramas do fosfato.

$$396 \text{ g} \text{ --- } 502 \text{ g}$$

$$26,4 \text{ g} \text{ --- } x$$

$$x = 33,47 \text{ g}$$

Onde x é a massa teórica do produto na reação, ou seja, a massa a ser obtida caso a reação se complete sem perdas.

Para o cálculo do rendimento prático, realizamos outra conta semelhante.

$$33,47 \text{ g} \text{ --- } 100\%$$

$$29,30 \text{ g} \text{ --- } y$$

$$y = 87,54\%$$

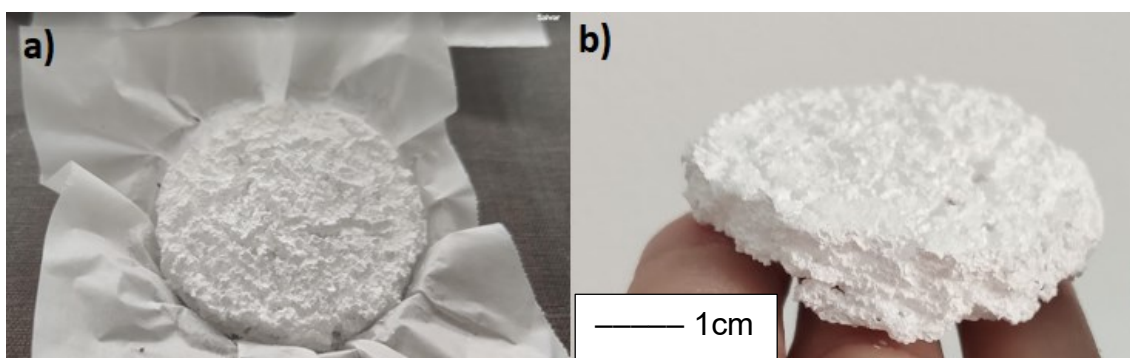
Onde y é o rendimento prático da reação.

A diferença entre os rendimentos teórico e prático da reação pode ter origem em diversos fatores. Dentre eles, podem ser citados a presença de reações paralelas, formando subprodutos indesejados, reversibilidade da reação, tornando-a incompleta, e a perda de produto durante o processo de síntese, em transferências, filtragens, manipulação do material, etc.

4.3 AVALIAÇÃO DA TÉCNICA LAPES PARA PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS DE HIDROXIAPATITA

O método LAPES foi empregado para a produção do *scaffold*. Devido às propriedades inerentes à cerâmica, a espuma não passou por um processo de expansão tão expressivo quanto a alumina. Mais ajustes ainda se fazem necessários para aperfeiçoar a técnica e adapta-la para o uso com a hidroxiapatita (Figura 10a e b).

Figura 10 – *Scaffold* produzido com hidroxiapatita a) após secagem e b) após sinterização



Fonte: Autoria Própria (2019)

4.4 REOLOGIA DAS SUSPENSÕES

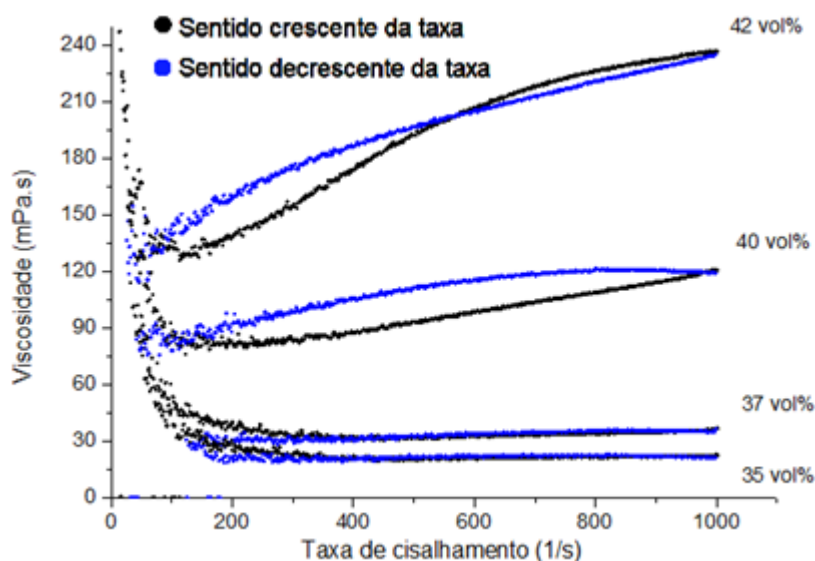
O reômetro rotacional utilizado traz como resposta gráficos que relacionam a viscosidade dinâmica com a taxa de cisalhamento aplicada no fluido. Ao aumentar e o torque, o software captura duas curvas, uma com taxa crescente ($0 - 1000 \text{ s}^{-1}$) e outra com taxa decrescente ($1000 - 0 \text{ s}^{-1}$).

No processo de espumação direta, a taxa de cisalhamento reportada na literatura com valores de até 100 s^{-1} , (HABIBI, DINKGREVE, *et al.*, 2016, SEPULVEDA, BINNER, 1999), será a taxa utilizada para comprar as viscosidades das diferentes suspensões avaliadas.

4.4.1 Dispersões de Alumina Realizadas por Agitação Mecânica

O gráfico 1 indica a curva para as dispersões de alumina realizadas com o Dispermat com diferentes porcentagens volumétricas de sólidos. Podemos verificar que para baixas quantidades de fração de sólidos (35 e 37 vol%), as suspensões possuem uma quantidade de histerese (área entre as curvas das taxas crescente e decrescente) ínfima, o que indica uma excelente estabilidade da suspensão e uma viscosidade aparente praticamente constante em relação à variação dessa taxa de cisalhamento, comportamento que define um fluido newtoniano. Nas curvas a partir de 40 vol% de alumina, entretanto, é observável um comportamento de fluido não newtoniano (surgimento de histerese, com viscosidade variável) o que pode ser um indício de que a dispersão não esteja perfeitamente defloculada, devido ao aumento do volume de sólidos.

Gráfico 1 – Curvas de viscosidade para suspensões de alumina produzidas com agitação mecânica



4.4.2 Dispersões de Alumina Realizadas por Processador Ultrassônico

Os gráficos 2 e 3 indicam as curvas para as dispersões de alumina realizadas com o dispersor ultrassônico com diferentes porcentagens volumétricas de sólidos. Podemos observar que, além das curvas para suspensões com 35 e 37 vol% de alumina, a de curva para 42 vol% teve uma considerável redução na quantidade de histerese, indicando que as suspensões foram defloculadas de maneira mais eficiente através do processo de dispersão ultrassônica. Uma suspensão com 45 vol% foi possível ser avaliada, embora tenha apresentado maior histerese, além de um aumento considerável nos valores de viscosidade em relação às outras suspensões.

Gráfico 2 – Curvas de viscosidade para suspensões de alumina produzidas por dispersão ultrassônica (35, 37 e 42 vol%)

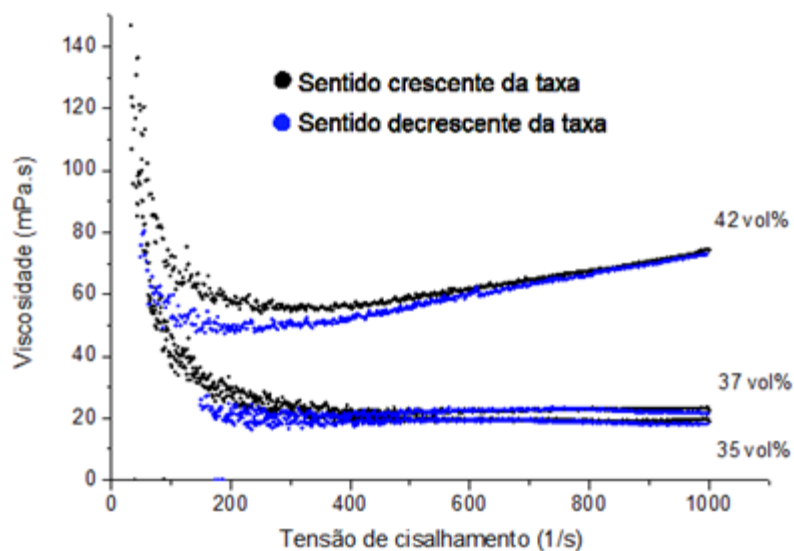
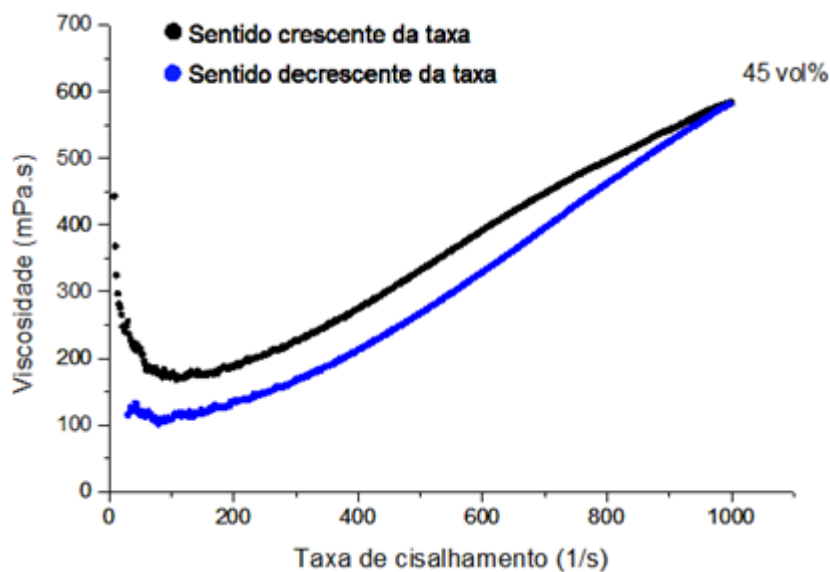


Gráfico 3 – Curva de viscosidade para suspensão de alumina produzida por dispersão ultrassônica (45 vol%)



Com os resultados apresentados nas figuras acima, foi possível afirmar duas situações: a agitação pelo método de dispersor ultrassônico produz suspensões mais estabilizadas (mais dispersas), e como consequência disso, a dispersão de 45 vol% foi produzida, embora tenha apresentado viscosidades não desejáveis para o processamento. Além disso, a suspensão de alumina dispersada com agitador mecânico apresenta característica reopética, por sua vez, a suspensão de alumina

dispersada por processo ultrassônico, apresenta característica tixotrópica. A dispersão de 42vol%. apresentou valor de viscosidade, em 100 s^{-1} , com a metade da magnitude apresentada pelo método de agitação mecânica.

4.4.3 Dispersões de Hidroxiapatita Dispersas por Processo Ultrassônico

Os gráficos 4 e 5 indicam as curvas para as dispersões de hidroxiapatita realizadas com o dispersor ultrassônico com diferentes porcentagens volumétricas de sólidos. É notável que em iguais concentração de sólido, dispersões de hidroxiapatita e alumina possuem viscosidades bastante diferentes. Isso se dá pelas propriedades de solubilidade de cada cerâmica. Uma vez que a proposta desta análise foi a de verificar a porcentagem volumétrica de sólidos ótima para a suspensão de HAp, este resultado já era esperado. Com 37 vol% de hidroxiapatita, nota-se uma baixíssima histerese e pouca variação de viscosidade em relação à variação da taxa de cisalhamento. Nas curvas da suspensão de 40 vol%, já é possível observar uma certa quantidade de histerese, e para 42 vol% e 45 vol% de sólidos, as curvas começam a indicar dispersões com baixa estabilidade e comportamentos indesejados.

Gráfico 4 – Curvas de viscosidade para suspensões de hidroxiapatita produzidas por dispersão ultrassônica

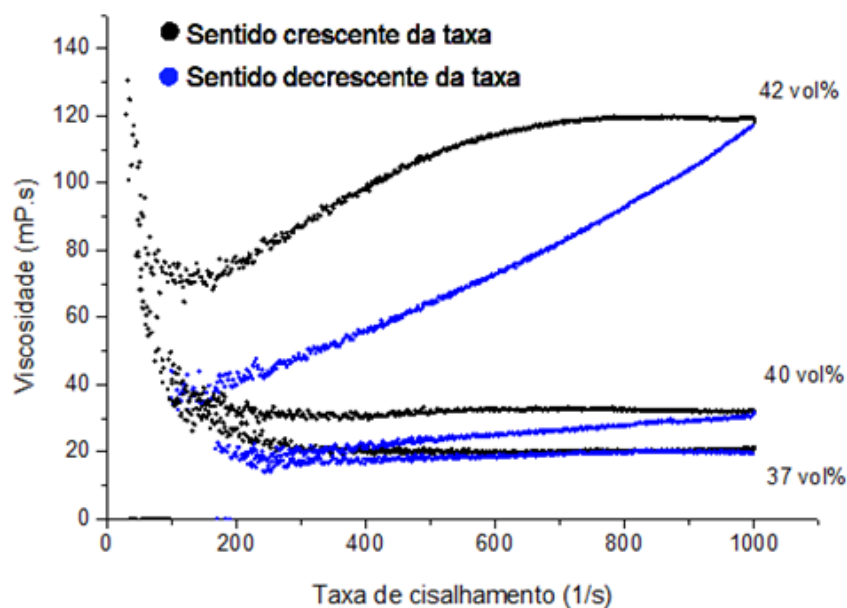
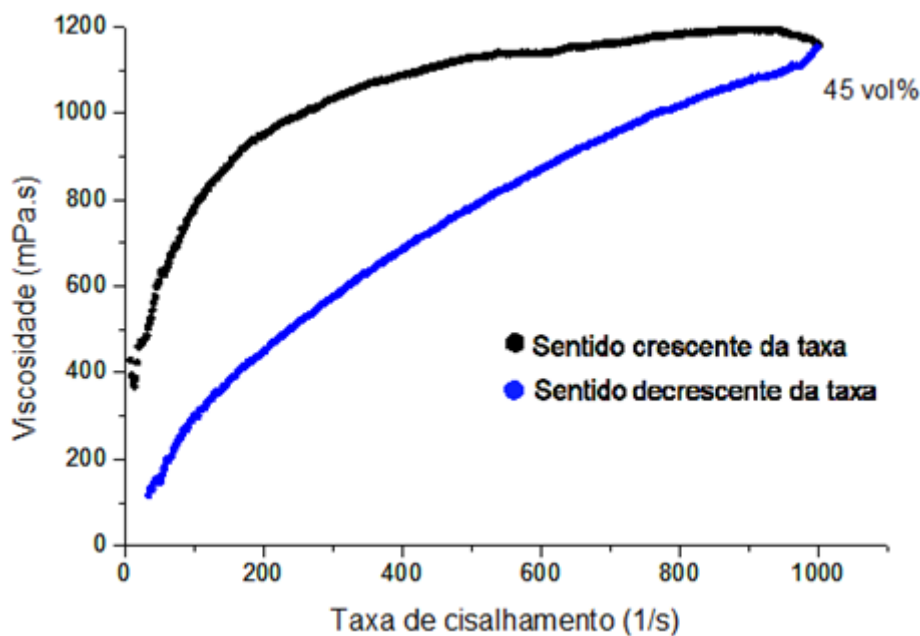


Gráfico 5 – Curva de viscosidade para suspensão de hidroxiapatita produzida por dispersão ultrassônica



Com base nos gráficos 4 e 5 verificou-se que o comportamento reológico da HAp e da Alumina, apresentam características diferentes. A HAp com 42%, apresenta valores de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, na rampa de subida, muito similares aos apresentados pela alumina, entretanto, ela apresenta maior tixotropia

nessa concentração de sólidos, em que as viscosidades permanecem maiores mesmo com a redução da taxa de cisalhamento. Isso é decorrente de interações entre as partículas, e precisa ser melhor investigado de modo a tornar esse comportamento similar a alumina. Dessa forma, será possível a produção de scaffolds como morfologias similares às morfologias apresentadas pelos scaffolds de alumina.

4.5 ANÁLISE DA MICROESTRUTURA DAS ESPUMAS CERÂMICAS

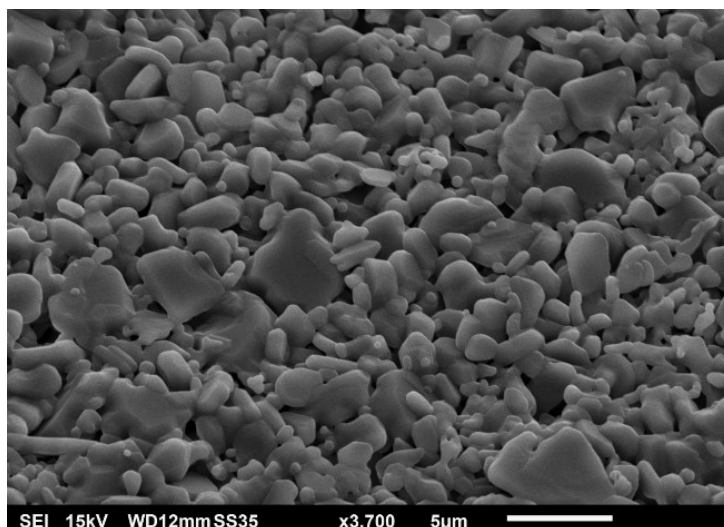
Com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura, cedido pelo Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz), os *scaffolds* de alumina foram observados para investigação de parâmetros como tamanhos de partícula, poro e conexões.

O *scaffold* de hidroxiapatita foi analisado na própria UTFPR.

4.5.1 Microestrutura do *Scaffold* de Alumina

Como esperado, as espumas de alumina foram devidamente produzidas através do processo de espumação proposto por Barg e equipe (BARG, SOLTMANN, *et al.*, 2008). A microestrutura da espuma foi analisada em via microscopia eletrônica de varredura (MEV) para averiguação do tamanho de partícula, dimensão dos poros e conexões formados na estrutura. A Figura 11 mostra as partículas de alumina na estrutura da espuma após a sinterização.

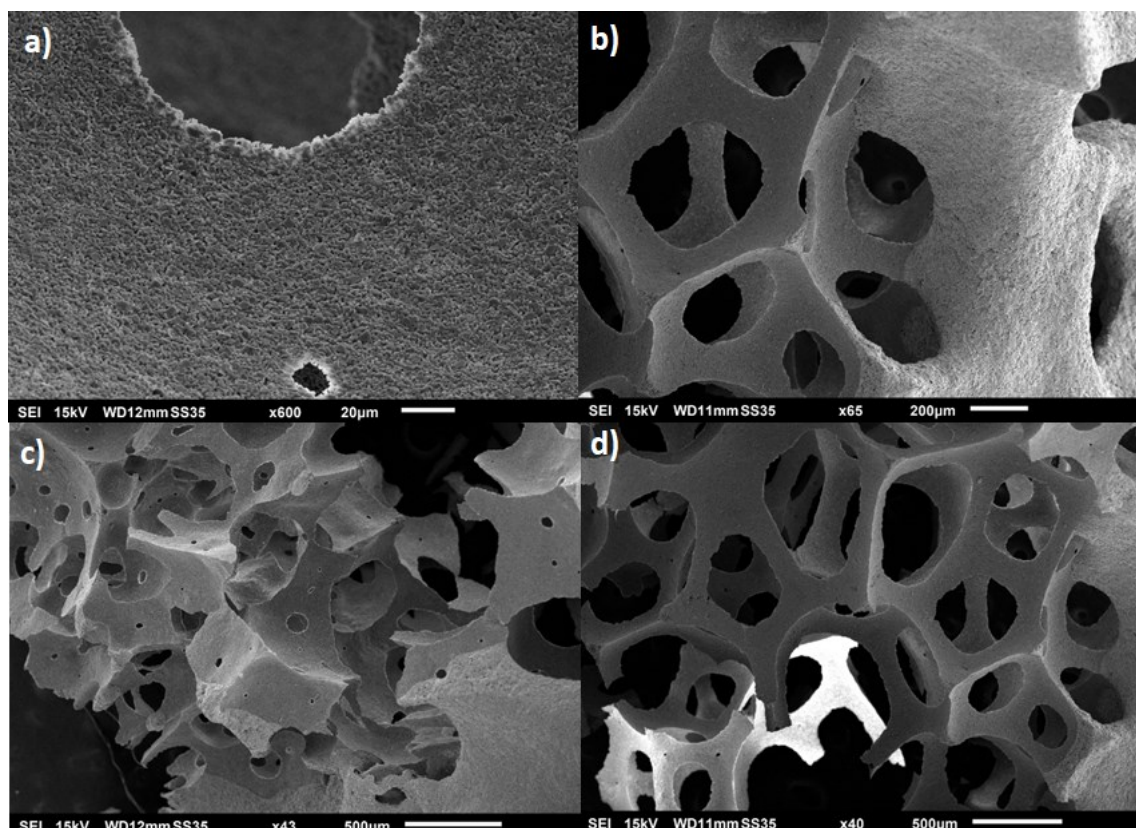
Figura 11 – Partículas de alumina em estrutura sólida sinterizada



Fonte: A autoria própria (2019)

Nas Figura 12a, b, c e d, com uma amplificação menor, é possível analisar o tamanho dos poros na estrutura, e das “janelas” que garantem a conexão entre os poros necessária para que os nutrientes possam adentrar na estrutura, garantindo a alimentação das células. Essas interconexões também são importantes para a liberação de substâncias quando o propósito da espuma é atuar como carreador de moléculas.

Figura 12 – Imagens do scaffold tiradas com microscópio eletrônico de varredura usando amplificação de a) 600, b) 65, c) 43 e d) 40 vezes.



Fonte: Autoria própria (2019)

Podemos observar, pelas microfotografias obtidas (Figura 11 e Figura 12), tamanhos de poro bastante variados, entre 200 μm e 1000 μm e conexões variando de tamanhos menores que 20 μm até algumas centenas de micrômetros, valores próximos aos encontrados na literatura. Este resultado indica que a técnica desenvolvida por Barg e colaboradores (BARG, SOLTMANN, *et al.*, 2008) pode vir a ser adaptada para a produção de *scaffolds* biocerâmicos para aplicações em engenharia de tecidos.

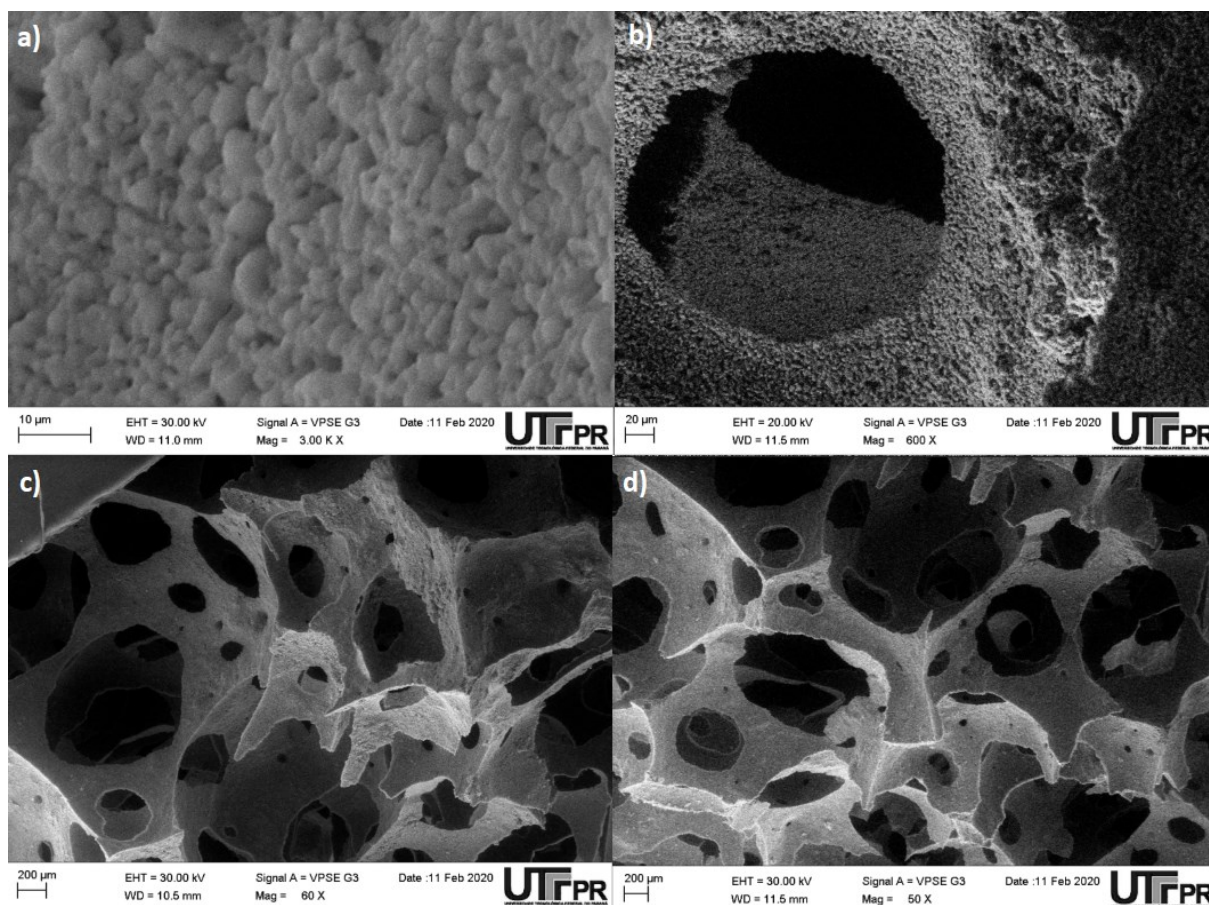
4.5.2 Microestrutura do *Scaffold* de Hidroxiapatita

A emulsão de hidroxiapatita passou por um processo de expansão consideravelmente menor que a de alumina. Ainda assim, foi possível observar a

presença de poros na estrutura resultante da sinterização, como mostrado na figura 13.

O *scaffold* foi analisado na UTFPR com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (MODELO). As Figura 13a, b, c e d mostram microfotografias da peça.

Figura 13 – Imagens do *scaffold* tiradas com microscópio eletrônico de varredura usando amplificação de a) 3000, b) 600, c) 60 e d) 50 vezes.



Fonte: Autoria própria (2020)

As figuras mostram uma estrutura com uma grande quantidade de vazios. É percebido de maneira clara uma maior espessura das paredes dos poros em relação ao *scaffold* de alumina, o que garante uma maior resistência mecânica à peça. Poros com tamanhos igualmente bastante variados na casa das centenas de micrômetros, e conexões com escala aproximada às daquelas do *scaffold* produzido com a alumina.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Suportes (ou *scaffolds*) biocerâmicos são de grande importância para a engenharia biomédica, mais especificamente na área de engenharia de tecidos duros. Este trabalho teve como ambição revisar o estado da arte dos métodos de fabricação dos *scaffolds* e fazer uma prospecção de técnicas para abrir caminhos à novas pesquisas e possibilidades.

Foram validados alguns dos métodos mais comuns de fabricação, sendo eles a impressão por extrusão de pasta cerâmica, a liofilização e a espumação direta utilizando alcanos leves e médios com agentes de formação de poros – este último pouco explorado na área biomédica.

Scaffolds de alumina foram devidamente fabricados pelo método LAPES, enquanto o processo de liofilização da suspensão cerâmica formou uma estrutura densa, e a emulsão utilizada para impressão não obteve uma estabilidade reológica compatível com o processo.

Um estudo mais aprofundado foi realizado a fim de adaptar o processo de espumação para a formação de *scaffolds* de hidroxiapatita, analisando a reologia das suspensões, e, embora tenha sido possível a fabricação dos *scaffolds* de hidroxiapatita, trabalhos futuros são necessários para que o método seja aperfeiçoado, e a peça produzida apresente características similares as peças de alumina produzidas pela mesma técnica.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

a) Estudar acerca do controle de parâmetros da produção da hidroxiapatita com alta pureza.

b) Produzir suspensões de hidroxiapatita de alta pureza utilizando diferentes concentrações de sólido para testes com espumação direta.

c) Calibrar parâmetros da impressora 3D e produzir pastas cerâmicas de hidroxiapatita de alta pureza utilizando a sílica pirolítica como aditivo estabilizante para a criação de *scaffolds*.

d) Construir aparato apropriado para a fabricação de *scaffolds* através de *freezercasting*.

e) Realizar testes *in vitro* de cultivo celular utilizando o *scaffold* de hidroxiapatita de alta pureza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, K., SINGH, G., PURI, D., *et al.* "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Powder by Sol-Gel Method for Biomedical Application", v. 10, n. 8, p. 727–734, 2011. .
- AHMED, I., PARSONS, A. J., SCOTCHFORD, C. A., *et al.* "Investigating the use of coupling agents to improve the interfacial properties between a resorbable phosphate glass and polylactic acid matrix", **Journal of Biomaterials Applications**, v. 28, n. 3, p. 354–366, 2012. DOI: 10.1177/0885328212453634. .
- ANDRONESCU, E., FICAI, M., VOICU, G., *et al.* "Synthesis and characterization of collagen/hydroxyapatite: Magnetite composite material for bone cancer treatment", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p. 2237–2242, 2010. DOI: 10.1007/s10856-010-4076-7. .
- BACH, L. G., RAFIQUUL ISLAM, M., VO, T. S., *et al.* "Poly(allyl methacrylate) functionalized hydroxyapatite nanocrystals via the combination of surface-initiated RAFT polymerization and thiol-ene protocol: A potential anticancer drug nanocarrier", **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, n. 1, p. 132–140, 2013. DOI: 10.1016/j.jcis.2012.11.068. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.11.068>.
- BAJPAI, P. K., BENGHUZZI, H. A. "Ceramic systems for long-term delivery of chemicals and biologicals", **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 22, n. 12, p. 1245–1266, 1988. DOI: 10.1002/jbm.820221212. .
- BARG, S., MORAES, E. G. De, KOCH, D., *et al.* "New cellular ceramics from high alkane phase emulsified suspensions (HAPES)", v. 29, p. 2439–2446, 2009. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2009.02.003. .
- BARG, S., SOLTMANN, C., ANDRADE, M., *et al.* "Cellular Ceramics by Direct Foaming of Emulsified Ceramic Powder Suspensions", **Journal of the American Ceramic Society**, v. 91, n. 9, p. 2823–2829, set. 2008. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2008.02553.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551->

2916.2008.02553.x. Acesso em: 19 jul. 2018.

BARROUG, A., KUHN, L. T., GERSTENFELD, L. C., *et al.* "Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: In vitro controlled adsorption and release", **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, n. 4, p. 703–708, 2004. DOI: 10.1016/j.orthres.2003.10.016. .

BAUER, I. W., LI, S. P., HAN, Y. C., *et al.* "Internalization of hydroxyapatite nanoparticles in liver cancer cells", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 3, p. 1091–1095, 2008. DOI: 10.1007/s10856-007-3124-4. .

BETSIOU, M., BANTSIS, G., ZOI, I., *et al.* "Adsorption and release of gemcitabine hydrochloride and oxaliplatin by hydroxyapatite", **Ceramics International**, v. 38, n. 4, p. 2719–2724, 2012. DOI: 10.1016/j.ceramint.2011.11.040. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.11.040>.

BHASKAR, S., PARK, J. G., LEE, K. S., *et al.* "Thermal and mechanical behavior of ZrTiO₄-TiO₂ porous ceramics by direct foaming", **Ceramics International**, v. 42, n. 13, p. 14395–14402, 2016. DOI: 10.1016/j.ceramint.2016.06.019. .

BOHNER, M., VAN LENTHE, G. H., GRÜNENFELDER, S., *et al.* "Synthesis and characterization of porous β -tricalcium phosphate blocks", **Biomaterials**, v. 26, n. 31, p. 6099–6105, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.026. .

BOHNER, Marc, LEMAÎTRE, J., MERKLE, H. P., *et al.* "Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid)", **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 10, p. 1262–1270, 2000. DOI: 10.1002/1520-6017(200010)89:10<1262::AID-JPS4>3.0.CO;2-7. .

BOSE, S., ROY, M., BANDYOPADHYAY, A. "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds", **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 546–554, 2012. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>.

BOTA, P. C. S., COLLIE, A. M. B., PUOLAKKAINEN, P., *et al.* "Biomaterial topography alters healing in vivo and monocyte/macrophage activation in vitro", **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 95 A, n. 2, p. 649–657, 2010. DOI: 10.1002/jbm.a.32893. .

BUCKLES, R. G. "Biomaterials for drug delivery systems", **Nature India**, v. 17, p. 109–128, 1983. DOI: 10.1038/nindia.2011.157. .

BURG, K. J. L., PORTER, S., KELLAM, J. F. "Biomaterial developments for bone tissue engineering", v. 21, 2000. .

BURGOS, A. E., BELCHIOR, J. C., SINISTERRA, R. D. "Controlled release of rhodium (II) carboxylates and their association complexes with cyclodextrins from hydroxyapatite matrix", **Biomaterials**, v. 23, n. 12, p. 2519–2526, 2002. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00386-6. .

CARRAGEE, E. J., HURWITZ, E. L., WEINER, B. K. "A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: Emerging safety concerns and lessons learned", **Spine Journal**, v. 11, n. 6, p. 471–491, 2011. DOI: 10.1016/j.spinee.2011.04.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.spinee.2011.04.023>.

CAUSA, F., NETTI, P. A., AMBROSIO, L. "A multi-functional scaffold for tissue regeneration: The need to engineer a tissue analogue", **Biomaterials**, v. 28, n. 34, p. 5093–5099, 2007. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.030. .

CHAI, F., ABDELKARIM, M., LAURENT, T., *et al.* "Poly-cyclodextrin functionalized porous bioceramics for local chemotherapy and anticancer bone reconstruction", **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 102, n. 6, p. 1130–1139, 2014. DOI: 10.1002/jbm.b.33094. .

CHANG, M. C., TANAKA, J. "FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde.", **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4811–8, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361620>.

CHEN, J., LUO, Y., HONG, L., *et al.* "Synthesis, characterization and osteoconductivity properties of bone fillers based on alendronate-loaded poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite microspheres", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 3, p. 547–555, 2011. DOI: 10.1007/s10856-011-4232-8. .

CHEN, S., SHI, Y., LUO, Y., *et al.* "Layer-by-layer coated porous 3D printed hydroxyapatite composite scaffolds for controlled drug delivery", **Colloids and**

Surfaces B: Biointerfaces, v. 179, p. 121–127, 2019. DOI:

10.1016/j.colsurfb.2019.03.063. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.063>.

CHENG, Z., YANG, Y. C., WU, Z. P. "Controlling the Structure of Hydroxyapatite Ceramics with Dual Pores Prepared Using Freeze-Casting", **Journal of Nanotechnology**, v. 2018, p. 1–5, 2018. DOI: 10.1155/2018/7531464. .

CHRISTENSEN, B. T. "Physical Fractionation of Soil and Organic Matter in Primary Particle Size and Density Separates", v. 20, p. 1–90, 1992. DOI: 10.1007/978-1-4612-2930-8_1. .

COLONETTI, V. C., SANCHES, M. F., DE SOUZA, V. C., *et al.* "Cellular ceramics obtained by a combination of direct foaming of soybean oil emulsified alumina suspensions with gel consolidation using gelatin", **Ceramics International**, v. 44, n. 2, p. 2436–2445, 2018. DOI: 10.1016/j.ceramint.2017.10.215. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.10.215>.

DAPPORTO, M., SPRIO, S., FABBI, C., *et al.* "A novel route for the synthesis of macroporous bioceramics for bone regeneration", **Journal of the European Ceramic Society**, v. 36, n. 9, p. 2383–2388, 2016. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2015.10.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2015.10.020>.

DAUGELA, P., PRANSKUNAS, M., JUODZBALYS, G., *et al.* "Novel cellulose/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration: In vitro and in vivo study", **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 5, p. 1195–1208, 2018. DOI: 10.1002/term.2651. .

DOU, X. C., ZHU, X. P., ZHOU, J., *et al.* "Minocycline-released hydroxyapatite-gelatin nanocomposite and its cytocompatibility in vitro", **Biomedical Materials**, v. 6, n. 2, 2011. DOI: 10.1088/1748-6041/6/2/025002. .

EL-GHANNAM, A. **Bone reconstruction: From bioceramics to tissue engineering. Expert Review of Medical Devices**. [S.l.: s.n.]. , 2005

ELIAZ, N., METOKI, N., ELIAZ, N., *et al.* "Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical

Applications.", **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 4, p. 334, mar. 2017. DOI: 10.3390/ma10040334. .

EPSTEIN, N. "Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: The evidence continues to mount", **Surgical Neurology International**, infuse 27/04, v. 4, n. 6, p. 343, 2013. DOI: 10.4103/2152-7806.114813. .

EPSTEIN, N. "Pros, cons, and costs of INFUSE in spinal surgery", **Surgical Neurology International**, infuse 27/04, v. 2, n. 1, p. 10, 2011. DOI: 10.4103/2152-7806.76147. .

ERBE, E., MARX, J., CLINEFF, T., *et al.* "Potential of an ultraporous β -tricalcium phosphate synthetic cancellous bone void filler and bone marrow aspirate composite graft", **European Spine Journal**, v. 10, n. SUPPL. 2, p. 141–146, 2001. DOI: 10.1007/s005860100287. .

FINOLI, A., OSTROWSKI, N., SCHMELZER, E., *et al.* " Multiscale porous ceramic scaffolds for in vitro culturing of primary human cells ", **Advances in Applied Ceramics**, v. 111, n. 5–6, p. 262–268, 2012. DOI: 10.1179/1743676111y.0000000072. .

FRANCHIN, G., WAHL, L., COLOMBO, P. "Direct ink writing of ceramic matrix composite structures", **Journal of the American Ceramic Society**, v. 100, n. 10, p. 4397–4401, 2017. DOI: 10.1111/jace.15045. .

FU, H., RAHAMAN, M. N., BROWN, R. F., *et al.* "Evaluation of BSA protein release from hollow hydroxyapatite microspheres into PEG hydrogel", **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 2245–2250, 2013. DOI: 10.1016/j.msec.2013.01.048. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.048>.

FU, H., RAHAMAN, M. N., DAY, D. E., *et al.* "Hollow hydroxyapatite microspheres as a device for controlled delivery of proteins", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 3, p. 579–591, 2011. DOI: 10.1007/s10856-011-4250-6. .

FU, Q., RAHAMAN, M. N., DOGAN, F., *et al.* "Freeze-cast hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications", **Biomedical Materials**, v. 3, n. 2, 2008.

DOI: 10.1088/1748-6041/3/2/025005. .

FUKASAWA, T., ANDO, M., OHJI, T., *et al.* "Synthesis of Porous Ceramics with Complex Pore Structure by Freeze-Dry Processing", **Journal of the American Ceramic Society**, v. 84, n. 1, p. 230–232, 2001. DOI: 10.1111/j.1151-2916.2001.tb00638.x. .

GAIKWAD, V. V., PATIL, A. B., GAIKWAD, M. V. "Scaffolds for Drug Delivery in Tissue Engineering", **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 1, n. 2, p. 113–122, 2008. .

GHORBANI, F., NOJEHDEHIAN, H., ZAMANIAN, A. "Physicochemical and mechanical properties of freeze cast hydroxyapatite-gelatin scaffolds with dexamethasone loaded PLGA microspheres for hard tissue engineering applications", **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 208–220, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2016.06.079. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.079>.

GHOSH, S. K., NANDI, S. K., KUNDU, B., *et al.* "In vivo response of porous hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds", **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 86, n. 1, p. 217–227, 2008. DOI: 10.1002/jbm.b.31009. .

GREGOROVÁ, E., PABST, W., UHLÍŘOVÁ, T., *et al.* "Processing, microstructure and elastic properties of mullite-based ceramic foams prepared by direct foaming with wheat flour", **Journal of the European Ceramic Society**, v. 36, n. 1, p. 109–120, 2016. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2015.09.028. .

GUO, Y., SHI, X., FANG, Q., *et al.* "Facile preparation of hydroxyapatite-chondroitin sulfate hybrid mesoporous microrods for controlled and sustained release of antitumor drugs", **Materials Letters**, v. 125, p. 111–115, 2014. DOI: 10.1016/j.matlet.2014.03.084. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.03.084>.

HABIBI, M., DINGGREVE, M., PAREDES, J., *et al.* "Normal stress measurement in foams and emulsions in the presence of slip", **Journal of Non-Newtonian Fluid**

Mechanics, v. 238, p. 33–43, dez. 2016. DOI: 10.1016/j.jnnfm.2016.06.008. .

HAYDEN, R. S., VOLLRATH, M., KAPLAN, D. L. "Effects of clodronate and alendronate on osteoclast and osteoblast co-cultures on silk-hydroxyapatite films",

Acta Biomaterialia, v. 10, n. 1, p. 486–493, 2014. DOI:

10.1016/j.actbio.2013.09.028. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.028>.

HOLMES, R. E., HAGLER, H. K. "Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in cranial reconstruction: A histometric study", **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 81, n. 5, p. 662–671, maio 1988. DOI: 10.1097/00006534-198805000-00003. .

HRYNIUK, W. M., FIGUEREDO, A., GOODYEAR, M. "Applications of dose intensity to problems in chemotherapy of breast and colorectal cancer", **Seminars in Oncology**, v. 14, n. 4 SUPPL. 4, p. 3–11, 1987. .

INZANA, J. A., OLVERA, D., FULLER, S. M., *et al.* "3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration", **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 4026–4034, 2014. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.064. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.064>.

ITOKAZU, M., SUGIYAMA, T., OHNO, T., *et al.* "Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents", **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 39, n. 4, p. 536–538, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(19980315)39:4<536::AID-JBM5>3.0.CO;2-K. .

JANA, D. C., SUNDARARAJAN, G., CHATTOPADHYAY, K. "Effect of Porosity on Structure, Young's Modulus, and Thermal Conductivity of SiC Foams by Direct Foaming and Gelcasting", **Journal of the American Ceramic Society**, v. 100, n. 1, p. 312–322, 2017. DOI: 10.1111/jace.14544. .

JOHARI, B., AHMADZADEHZARAJABAD, M., AZAMI, M., *et al.* "Repair of rat critical size calvarial defect using osteoblast-like and umbilical vein endothelial cells seeded in gelatin/hydroxyapatite scaffolds", **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 104, n. 7, p. 1770–1778, 2016. DOI: 10.1002/jbm.a.35710. .

KIM, H. W., KNOWLES, J. C., KIM, H. E. "Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard

tissue scaffolds", **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 72, n. 2, p. 136–145, 2005. DOI: 10.1002/jbm.a.30168. .

KIM, K., DEAN, D., LU, A., *et al.* "Early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells is influenced by both hydroxyapatite nanoparticle content and initial cell seeding density in biodegradable nanocomposite scaffolds", **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 3, p. 1249–1264, 2011. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.11.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.007>.

KINGERY, W. D., BOWEN, H. K., UHLMANN, D. R. **Introduction to ceramics**. [S.I.], John Wiley & sons, 1976. v. 17.

KOJIMA, C., WATANABE, K., NAGAYASU, T., *et al.* "Preparation of hydroxyapatite-decorated poly(lactide-co-glycolide) microspheres for paclitaxel delivery", **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 12, 2013. DOI: 10.1007/s11051-013-2098-z. .

KULINETS, I., "Biomaterials and their applications in medicine". **Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices**, [S.I.], Elsevier Inc., 2015. p. 1–10. DOI: 10.1533/9780857099204.1.

KUNDU, B., GHOSH, D., SINHA, M. K., *et al.* "Doxorubicin-intercalated nano-hydroxyapatite drug-delivery system for liver cancer: An animal model", **Ceramics International**, v. 39, n. 8, p. 9557–9566, 2013. DOI: 10.1016/j.ceramint.2013.05.074. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.05.074>.

KUNIEDA, K., SEKI, T., NAKATANI, S., *et al.* "Implantation treatment method of slow release anticancer doxorubicin containing hydroxyapatite (DOX-HAP) complex. A basic study of a new treatment for hepatic cancer", **British Journal of Cancer**, v. 67, n. 4, p. 668–673, 1993. DOI: 10.1038/bjc.1993.124. .

LEE, H., JANG, T. S., SONG, J., *et al.* "The production of porous hydroxyapatite scaffolds with graded porosity by sequential freeze-casting", **Materials**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2017. DOI: 10.3390/ma10040367. .

LEE, K. W., WANG, S., FOX, B. C., *et al.* "Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: Effects of resin formulations and laser parameters", **Biomacromolecules**, v. 8, n. 4, p. 1077–1084, 2007. DOI: 10.1021/bm060834v. .

LEMAIRE, V., BÉLAIR, J., HILDGEN, P. "Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n. 1–2, p. 95–107, 2003. DOI: 10.1016/S0378-5173(03)00165-0. .

LETIC-GAVRILOVIC, A., PIATTELLI, A., ABE, K. "Nerve growth factor β (NGF β) delivery via a collagen/hydroxyapatite (Col/HAP) composite and its effects on new bone ingrowth", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 2, p. 95–102, 2003. DOI: 10.1023/A:1022099208535. .

LI, qing, LEI, X., WANG, X., *et al.* **Hydroxyapatite /Collagen 3D printed Scaffolds and their Osteogenic Effects on hBMSCs**. [S.l: s.n.], 2019.

LI, Z., LIU, Z., YIN, M., *et al.* "Aptamer-capped multifunctional mesoporous strontium hydroxyapatite nanovehicle for cancer-cell-responsive drug delivery and imaging", **Biomacromolecules**, v. 13, n. 12, p. 4257–4263, 2012. DOI: 10.1021/bm301563q. .

LIANG, Y. H., LIU, C. H., LIAO, S. H., *et al.* "Cosynthesis of cargo-loaded hydroxyapatite/alginate core-shell nanoparticles (HAP@Alg) as pH-responsive nanovehicles by a pre-gel method", **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 4, n. 12, p. 6720–6727, 2012. DOI: 10.1021/am301895u. .

LIU, Z., YIN, X., YE, Q., *et al.* "Periodontal regeneration with stem cells-seeded collagen-hydroxyapatite scaffold", **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 1, p. 121–131, 2016. DOI: 10.1177/0885328216637978. .

LOH, Q. L., CHOONG, C. "Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size", **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 19, n. 6, p. 485–502, 2013. DOI: 10.1089/ten.teb.2012.0437. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2012.0437>.

LOMBARDI, M., PALMERO, P., HABERKO, K., *et al.* "Processing of a natural hydroxyapatite powder : From powder optimization to porous bodies development", v. 31, p. 2513–2518, 2011. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2011.02.017. .

LOPEZ, T., ORTIZ, E., ALEXANDER-KATZ, R., *et al.* "The effect of water on particle size, porosity and the rate of drug release from implanted titania reservoirs", **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 93, n. 2, p.

401–406, 2010. DOI: 10.1002/jbm.b.31595. .

LUO, Y., LING, Y., GUO, W., *et al.* "Docetaxel loaded oleic acid-coated hydroxyapatite nanoparticles enhance the docetaxel-induced apoptosis through activation of caspase-2 in androgen independent prostate cancer cells", **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 2, p. 278–288, 2010. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.07.108. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.108>.

MANAFI, S. A., JOUGHEHDOUST, S. "Synthesis of Hydroxyapatite Nanostructure by Hydrothermal Condition for Biomedical Application", **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 89–94, 2009. .

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, F. J., CABAÑAS, M. V., PARIS, J. L., *et al.* "Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration", **Acta Biomaterialia**, v. 15, n. 2015, p. 200–209, 2015. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.12.021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.12.021>.

MEENA, R., KESARI, K. K., RANI, M., *et al.* "Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human breast cancer cells (MCF-7)", **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 2, 2012. DOI: 10.1007/s11051-011-0712-5. .

MEURICE, E., LERICHE, A., HORNEZ, J., *et al.* "Functionalisation of porous hydroxyapatite for bone substitutes", v. 32, p. 2673–2678, 2012. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2012.01.014. .

MIKHAIL, A. S., ALLEN, C. "Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: Transport at the whole body, tissue and cellular levels", **Journal of Controlled Release**, v. 138, n. 3, p. 214–223, 2009. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.04.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.04.010>.

MILLER, S. M., XIAO, X., FABER, K. T. "Freeze-cast alumina pore networks: Effects of freezing conditions and dispersion medium", **Journal of the European Ceramic Society**, v. 35, n. 13, p. 3595–3605, nov. 2015. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2015.05.012. .

MILLER, S. M., XIAO, X., SETLOCK, J. A., *et al.* "Freeze-cast alumina pore

networks: Effects of processing parameters in steady-state solidification regimes of aqueous slurries", **Journal of the European Ceramic Society**, v. 38, n. 15, p. 5134–5143, dez. 2018. DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2018.07.009. .

NAVIROJ, M., VOORHEES, P. W., FABER, K. T. "Suspension- and solution-based freeze casting for porous ceramics", **Journal of Materials Research**, v. 32, n. 17, p. 3372–3382, set. 2017. DOI: 10.1557/jmr.2017.133. .

NAVIROJ, M., WANG, M. M., JOHNSON, M. T., *et al.* "Nucleation-controlled freeze casting of preceramic polymers for uniaxial pores in Si-based ceramics", **Scripta Materialia**, v. 130, p. 32–36, mar. 2017. DOI: 10.1016/j.scriptamat.2016.10.038. .

NAYAK, A. K. "Hydroxyapatite Synthesis Methodologies : An Overview", v. 2, n. 2, p. 903–907, 2010. .

OLADAPO, B. I., ZAHEDI, S. A., ADEOYE, A. O. M. "3D printing of bone scaffolds with hybrid biomaterials", **Composites Part B: Engineering**, v. 158, n. July 2018, p. 428–436, 2019. DOI: 10.1016/j.compositesb.2018.09.065. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.09.065>.

OTSUKA, M., NAKAHIGASHI, Y., MATSUDA, Y., *et al.* "Effect of geometrical cement size on in vitro and in vivo indomethacin release from self-setting apatite cement", **Journal of Controlled Release**, v. 52, n. 3, p. 281–289, 1998. DOI: 10.1016/S0168-3659(97)00264-2. .

PALAZZO, B., IAFISCO, M., LAFORGIA, M., *et al.* "Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties", **Advanced Functional Materials**, v. 17, n. 13, p. 2180–2188, 2007. DOI: 10.1002/adfm.200600361. .

PATHI, S. P., LIN, D. D. W., DORVEE, J. R., *et al.* "Hydroxyapatite nanoparticle-containing scaffolds for the study of breast cancer bone metastasis", **Biomaterials**, v. 32, n. 22, p. 5112–5122, 2011. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.055. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.055>.

PERRI, B., COOPER, M., LAURYSSSEN, C., *et al.* "Adverse swelling associated with use of rh-BMP-2 in anterior cervical discectomy and fusion: a case study", **Spine Journal**, v. 7, n. 2, p. 235–239, 2007. DOI: 10.1016/j.spinee.2006.04.010. .

POLO-CORRALES L, LATORRE-ESTEVEZ M, R.-V. J. "Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology*", v. 14, n. 1, p. 15–56, 2014. DOI: 10.1109/TMI.2012.2196707. Separate. .

QUINLAN, E., THOMPSON, E. M., MATSIKO, A., *et al.* "Long-term controlled delivery of rhBMP-2 from collagen-hydroxyapatite scaffolds for superior bone tissue regeneration", **Journal of Controlled Release**, Artigo muito bom, semelhante ao citado em reunião. Scaffold de HA-colágeno produzido através de liofilização usado como drug carrier para a liberação de BMP-2 testado in vitro e in vivo em ratos. analisam a regeneração de defeitos ósseos comparando 3 grupos de amostras - um grupo em branco, sem scaffolds, um com scaffolds vazios e outro com a proteína., v. 207, p. 112–119, 2015. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.03.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.028>.

RAJA, N., YUN, H. S. "A simultaneous 3D printing process for the fabrication of bioceramic and cell-laden hydrogel core/shell scaffolds with potential application in bone tissue regeneration", **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 27, p. 4707–4716, 2016. DOI: 10.1039/c6tb00849f. .

REN, Y., SECONDARY, C. A., AUTHOR, C., *et al.* "Journal of Oral Implantology Porous collagen-hydroxyapatite scaffolds with mesenchymal stem cells for bone regeneration", [S.d.]. .

ROMAGNOLI, C., ASTA, F. D., BRANDI, M. L. "Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering", v. 10, n. 3, p. 155–161, 2013. .

ROOPAVATH, U. K., Malferrari, S., VAN HAVER, A., *et al.* "Optimization of extrusion based ceramic 3D printing process for complex bony designs", **Materials and Design**, v. 162, p. 263–270, 2019. DOI: 10.1016/j.matdes.2018.11.054. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.11.054>.

ROSETI, L., PARISI, V., PETRETTA, M., *et al.* "Scaffolds for Bone Tissue Engineering : State of the art and new perspectives", **Materials Science & Engineering C**, v. 78, p. 1246–1262, 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.

SABER-SAMANDARI, S., NEZAFATI, N., SABER-SAMANDARI, S. "The Effective

Role of Hydroxyapatite Based Composites in Anticancer Drug Delivery Systems", **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 33, n. 1, p. 41–75, 2016. DOI: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v33.i1.30. .

SANTOS, M. H., OLIVEIRA, M. De, PALHARES, L., *et al.* "Synthesis Control and Characterization of Hydroxyapatite Prepared by Wet Precipitation Process", v. 7, n. 4, p. 625–630, 2004. .

SARKAR, N., LEE, K. S., PARK, J. G., *et al.* "Mechanical and thermal properties of highly porous Al₂TiO₅–Mullite ceramics", **Ceramics International**, v. 42, n. 2, p. 3548–3555, 2016. DOI: 10.1016/j.ceramint.2015.11.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.11.002>.

SCHLIEPHAKE, H. "Clinical efficacy of growth factors to enhance tissue repair in oral and maxillofacial reconstruction: A systematic review", **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 17, n. 2, p. 247–273, 2015. DOI: 10.1111/cid.12114. .

SEARS, N., DHAVALIKAR, P., WHITELEY, M., *et al.* "Fabrication of biomimetic bone grafts with multi-material 3D printing", **Biofabrication**, v. 9, n. 2, p. 025020, maio 2017. DOI: 10.1088/1758-5090/aa7077. .

SEMYARI, H., SALEHI, M., TALEGHANI, F., *et al.* "Fabrication and characterization of collagen–hydroxyapatite-based composite scaffolds containing doxycycline via freeze-casting method for bone tissue engineering", **Journal of Biomaterials Applications**, v. 33, n. 4, p. 501–513, 2018. DOI: 10.1177/0885328218805229. .

SEPULVEDA, P., BINNER, J. G. P. "Processing of cellular ceramics by foaming and in situ polymerisation of organic monomers", **Journal of the European Ceramic Society**, v. 19, n. 12, p. 2059–2066, out. 1999. DOI: 10.1016/s0955-2219(99)00024-2. .

SHEIKH, Z., NAJEEB, S., KHURSHID, Z., *et al.* "Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications", **Materials**, p. 5744–5794, 2015. DOI: 10.3390/ma8095273. .

SHUAI, C., ZHUANG, J., HU, H., *et al.* "In vitro bioactivity and degradability of β -tricalcium phosphate porous scaffold fabricated via selective laser sintering", **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 60, n. 2, p. 266–273, 2013. DOI:

10.1002/bab.1064. .

ŚLÓSARCZYK, A., SZYMURA-OLEKSIK, J., MYCEK, B. "The kinetics of pentoxifylline release from drug-loaded hydroxyapatite implants", **Biomaterials**, v. 21, n. 12, p. 1215–1221, 2000. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00269-0. .

SOPYAN, I., SINGH, R., HAMDY, M. "Synthesis of nano sized hydroxyapatite powder using sol-gel technique and its conversion to dense and porous bodies", v. 47, n. November, p. 1626–1631, 2008. .

SOUZA, J. M. F. da S., AQUINO, A. L. F. de, BASTO, A. O. "Tratamento de ossificação heterotópica de quadril com uso de aparelho gessado: relato de caso", **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 53, n. 6, p. 805–808, 2017. DOI: 10.1016/j.rbo.2017.05.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2017.05.012>.

STUDART, A. R., GONZENBACH, U. T., TERVOORT, E., *et al.* "Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review", **Journal of the American Ceramic Society**, v. 89, n. 6, p. 1771–1789, jun. 2006. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1551-2916.2006.01044.x>. Acesso em: 19 jul. 2018.

SUN, T., ZHOU, K., LIU, M., *et al.* "Loading of BMP-2-related peptide onto three-dimensional nano-hydroxyapatite scaffolds accelerates mineralization in critical-sized cranial bone defects", **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 4, p. 864–877, 2018. DOI: 10.1002/term.2371. .

TANNOURY, C. A., AN, H. S. "Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery", **Spine Journal**, v. 14, n. 3, p. 552–559, 2014. DOI: 10.1016/j.spinee.2013.08.060. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.spinee.2013.08.060>.

TROMBETTA, R., INZANA, J. A., SCHWARZ, E. M., *et al.* "3D Printing of Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery", **Annals of Biomedical Engineering**, v. 45, n. 1, p. 23–44, 2017. DOI: 10.1007/s10439-016-1678-3. .

VENKATESAN, P., PUVVADA, N., DASH, R., *et al.* "The potential of celecoxib-

loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer", **Biomaterials**, v. 32, n. 15, p. 3794–3806, 2011. DOI:

10.1016/j.biomaterials.2011.01.027. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.027>.

WANG, E. A., ROSEN, V., ALESSANDRO, J. S. D., *et al.* "Wang Ea, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns M, LaPan P. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation.", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. March, p. 2220–2224, 1990. DOI:

10.1073/pnas.87.6.2220. .

WANG, X., LI, J. H., XIE, Y. M., *et al.* "Three-dimensional fully interconnected highly porous hydroxyapatite scaffolds derived from particle-stabilized emulsions",

Ceramics International, v. 42, n. 4, p. 5455–5460, 2016. DOI:

10.1016/j.ceramint.2015.12.088. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.12.088>.

WATANABE, K., NISHIO, Y., MAKIURA, R., *et al.* "Paclitaxel-loaded hydroxyapatite/collagen hybrid gels as drug delivery systems for metastatic cancer cells", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 446, n. 1–2, p. 81–86, 2013.

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.002. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.002>.

WILLIAMS, D. F. **The Williams Dictionary of Biomaterials**. [S.l.], Liverpool University Press, 2011.

WILSON, C. J., CLEGG, R. E., LEAVESLEY, D. I., *et al.* "Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review", **Tissue Engineering**, v. 11, n. 1–2, p. 1–18, 2005. DOI: 10.1089/ten.2005.11.1. .

WONG, J. Y., BRONZINO, J. D. **Biomaterials**. [S.l.: s.n.], 2007.

WU, Q., ZHANG, X., WU, B., *et al.* "Effects of microwave sintering on the properties of porous hydroxyapatite scaffolds", **Ceramics International**, v. 39, n. 3, p. 2389–2395, 2013. DOI: 10.1016/j.ceramint.2012.08.091. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.08.091>.

XIONG, L., ZENG, J., YAO, A., *et al.* "BMP2-loaded hollow hydroxyapatite microspheres exhibit enhanced osteoinduction and osteogenicity in large bone defects", **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 517–526, 2015. DOI: 10.2147/IJN.S74677. .

YAMAGUCHI, I., TOKUCHI, K., FUKUZAKI, H., *et al.* "Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites", **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, n. 1, p. 20–27, 2001. DOI: 10.1002/1097-4636(200104)55:1<20::AID-JBM30>3.0.CO;2-F. .

ZENG, X., ARAI, N., FABER, K. T. "Robust Cellular Shape-Memory Ceramics via Gradient-Controlled Freeze Casting", **Advanced Engineering Materials**, v. 21, n. 12, p. 1900398, dez. 2019. DOI: 10.1002/adem.201900398. .

ZHANG, L., YANG, G., JOHNSON, B. N., *et al.* "Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair", **Acta Biomaterialia**, v. 84, n. November, p. 16–33, 2019. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.11.039. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.039>.