



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
MATERIAIS

JOSÉ SILVIO VERAS ALBUQUERQUE

PRODUÇÃO DE BIOCIMENTOS DE APATITAS NANOMÉTRICAS APLICADOS
COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

FORTALEZA

2012

JOSÉ SILVIO VERAS ALBUQUERQUE

*PRODUÇÃO DE BIOCIMENTOS DE APATITAS NANOMÉTRICAS APLICADOS
COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Materiais.

Orientador: Professor Dr. Ricardo Emilio Ferreira Quevedo Nogueira.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia

A31p Albuquerque, José Sílvio Veras.
Produção de biocimentos de apatitas nanométricas aplicados como sistema de liberação controlada de fármacos / José Sílvio Veras Albuquerque. – 2012.
199 f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Propriedades físicas e mecânicas dos materiais.
Orientação: Prof. Dr. Ricardo Emilio F. Quevedo Nogueira.

1. Ciência dos materiais. 2. Materiais biomédicos. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE MATERIAIS

PARECER DA COMISSÃO DE TESE DE DOUTORADO

JOSÉ SILVIO VERAS ALBUQUERQUE

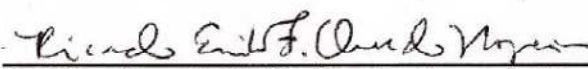
PRODUÇÃO DE BIOCIMENTOS DE APATITAS NANOMÉTRICAS APLICADAS
COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS

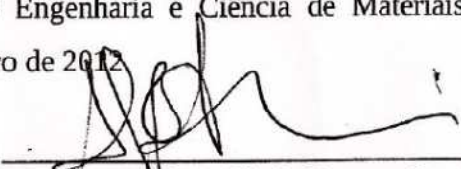
A Comissão de Tese composta pelos professores, Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira, Presidente e Orientador, da Universidade Federal do Ceará; Antônio Sérgio Bezerra Sombra, da Universidade Federal do Ceará; Enio Pontes de Deus, da Universidade Federal do Ceará; Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, da Universidade Estadual de Campinas e Marcelo Henrique Prado da Silva, do Instituto Militar de Engenharia, considera o candidato:

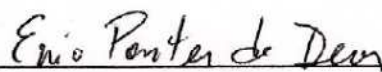
Aprovado

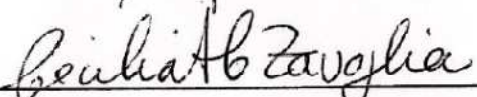
Não Aprovado

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais da
Universidade Federal do Ceará, em 03 de fevereiro de 2012


Prof. Dr. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira
Presidente e Orientador


Prof. Dr. Antônio Sérgio Bezerra Sombra
Membro


Prof. Dr. Enio Pontes de Deus
Membro


Prof. Dr. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Membro


Prof. Dr. Marcelo Henrique Prado da Silva
Membro

“A escada da vida tem degraus infinitos. Cada degrau conquistado, cada passo dado é um ato de realização.”

Jorge Cosendey

AGRADECIMENTOS

De uma maneira especial a Deus pelo privilégio de chegar onde estou, pela força, saúde, inspiração. Enfim, por tudo que me proporcionou e tem proporcionado.

Aos meus pais e irmãos, pelo incentivo e apoio aos estudos em todos os momentos da minha vida. Especialmente minha mãe.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Ao Professor Dr. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira, pela orientação e sugestões transmitidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha amiga Erisandra pela amizade, pela convivência, pelas discussões sempre positivas, pelas opiniões e auxílio na minha pesquisa.

Ao amigo Paulo pela amizade e colaboração.

A minha amiga Emmanuelle pelos ensaios de sinterização realizados no laboratório de Telecomunicações e Ciência e Engenharia de Materiais (UFC).

Ao laboratório de Raios X (UFC) pela realização dos ensaios de difração de raios X.

Ao laboratório de Caracterização de Materiais (UFC) pelos ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

Ao laboratório de Ensaio Mecânicos (UFC) pela realização dos ensaios de resistência à tração por compressão diametral.

Ao laboratório de Procedimentos Cerâmicos da Fundação Núcleo de

Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC), que contribui com as análises de porosidade.

Ao laboratório de Bioinorgânica (UFC) pelas análises de infravermelho.

Ao laboratório de Processos de Separação e Reação (UFC) pelas análises de determinação da distribuição do tamanho de partículas (B.E.T.).

A colega Bruna do laboratório de Processos de Separação e Reação (UFC) pela inestimável ajuda na realização das análises de Ultravioleta-Visível.

Aos amigos e colegas de laboratório Eden, Halisson, Jeann e Suely. Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o bom desenvolvimento dessa pesquisa, e que apesar de não citados nominalmente, foram de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os biocimentos de fosfatos de cálcio têm sido objeto de intenso estudo nos últimos anos devido à sua potencial utilidade em aplicações biomédicas. Entre outras aplicações, os biocimentos podem ser utilizados para liberar substâncias ativas no corpo humano, como antibióticos ou drogas anticâncer.

Neste trabalho, biocimentos de fosfato de cálcio, sob a forma pura ou combinada com sulfato de cálcio di-hidratado, foram investigados como matrizes em potencial para liberar ampicilina. O comportamento mecânico, o tempo de pega, o pH e a porosidade dos biocimentos foram avaliados utilizando amostras em formato de cilindros com 6 mm de altura e 12 mm de diâmetro. Os dados obtidos foram sujeitos a tratamento estatístico para comparar se as médias aritméticas entre os níveis de aditivos são estatisticamente significantes. Foi demonstrado que a aditivação do biocimento convencional DCPD produz um aumento significativo na resistência mecânica. Este aumento é devido à formação de cristais em forma de agulhas, que reforçam a matriz cristalina do biocimento. Ampicilina incorporada aos biocimentos foi liberada em solução tampão de fosfatos (PBS) à temperatura fisiológica e em diferentes tempos de imersão. As quantidades de fármaco liberadas foram estimadas a partir de medidas de absorvância no UV-Visível. Comparando os perfis de liberação, os resultados indicam que, em 120 minutos de experimento, 3,85% do fármaco são liberados da amostra BCF-10, enquanto a amostra BCF-00 libera praticamente o triplo, ou seja, 9,37%. Este decréscimo na taxa de liberação provavelmente ocorre em função da quantidade de poros presentes nas amostras.

Palavras-chave: Fosfato de cálcio, biomateriais, biocimento, fármaco.

ABSTRACT

Calcium phosphate biocements have been object of intense study in recent years due to their potential utility in biomedical applications. They can be used to liberate active substances in the human body, as antibiotic or anticancer drugs. In this work, calcium phosphate biocements under the pure or combined form with calcium sulphate had been investigated as to their potential to liberate ampicillin. Mechanical behavior, the time of handling, pH and the porosity of the biocements were evaluated using samples in the shape of cylinders with 6 mm of height and 12 mm of diameter. Test results were submitted to a statistical treatment to determine whether the arithmetic means of the different additive levels are statistically significant or not. It was demonstrated that the addition of sulphate to conventional biocement DCPD produces a significant increase in the mechanical resistance. This increase is probably due to the formation of needle-like crystals, that strengthen the crystalline matrix of the biocement. Ampicillin incorporated to the biocements was released in a buffer solution of phosphate (PBS) at the physiological temperature and in different times of immersion. The amounts of drug released were estimated from UV/VIS absorbance measurements of systems (samples) BCF-00 and BCF-10. Comparison of the release profiles indicate that in 120 minutes of experiment 3.85% of the drug were released from sample BCF-10, while sample BCF-00 liberates practically three times as much, that is, 9.37%. This decrease in the release tax probably occurs due to the amount of porosity of the samples.

Key words: Calcium phosphate, biomaterials, biocement, drug.

PUBLICAÇÕES SOBRE O TEMA DA TESE

Albuquerque, J. S. V.; Gonçalves, R. L.; Nogueira, R. E. F. Q., “**Síntese e Caracterização de Biocerâmicas Nanométricas**”. In: Anais 64^o Congresso Anual da Associação Brasileira de Metalurgia e de Materiais - ABM, Belo Horizonte – MG, 2009.

Giovanilton Ferreira da Silva, José Silvio Veras Albuquerque, Caroliny Gomes de Oliveira, Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira, and Andrea Lopes de Oliveira Ferreira. “**The Kinetics of Ampicillin Release from Hydroxyapatite for Bones Regeneration**” International Journal of Chemical Engineering, Volume 2009, 5 pages, 2008.

Albuquerque, J. S. V.; Franca, I. W. L.; Silva, G. F. ; Ferreira A. L. O.; Nogueira, R. E. F. Q. “**Macroporous Calcium Phosphate Bioceramics as Drug Release Agents: a Kinetics Study of Ampicillin Release**”. In: Bioceramics 21, Brasil, Key Engineering Materials Vols. 396-398, pp. 675-678, 2009

Giovanilton Ferreira da Silva, José Silvio Veras Albuquerque, Caroliny Gomes de Oliveira, Ricardo Emilio Ferreira Quevedo Nogueira, and Andrea Lopes de Oliveira Ferreira. “**The Kinetics of Ampicillin Release from Hydroxyapatite for Bones Regeneration**” Book of Abstracts, 10th International Chemical and Biological Engineering Conference. Braga – Portugal, 2008.

Albuquerque, J. S. V.; Alves, E. R.; Nogueira, R. E. F. Q. “**Análise Preliminar das Propriedades Físico-Mecânicas de Biocimentos de Apatitas Nanométricas**”, 6^o Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Gramado - RGS, 2010.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Aplicações clínicas das biocerâmicas no esqueleto humano	11
Figura 02. Estrutura do cristal hidroxiapatita.....	20
Figura 03. Estrutura do cristal β - fosfato tricálcio.....	22
Figura 04. Diagrama de solubilidade para o sistema ternário Ca(OH)_2 - H_3PO_4 - H_2O a 37°C . (a) isotermas de solubilidade mostrando $\log [\text{Ca}]$ e pH de soluções em equilíbrio com vários sais.....	26
Figura 05. Diagrama de solubilidade para o sistema ternário Ca(OH)_2 - H_3PO_4 - H_2O a 37°C . (b) isotermas de solubilidade mostrando $\log [\text{P}]$ e pH das soluções.....	26
Figura 06. Diagrama das células ósseas.....	38
Figura 07. Osso trabecular.....	39
Figura 08. Vista esquemática do osso cortical.....	40
Figura 09. Concentração de uma droga modelo no sangue com (a) dosagem tradicional da droga e (b) dosagem com liberação controlada.....	44
Figura 10. Comparação entre os modelos de cinética de liberação convencionais.....	50
Figura 11. Liberação controlada de drogas a partir de um dispositivo de reservatório típico: (a) sistema implantável ou oral, e (b) sistema transdérmico.....	51
Figura 12. Liberação de droga a partir de um sistema típico de matriz para liberação controlada.....	55
Figura 13. Ácido 6-Aminopenicilânico (6-Apa): Estrutura principal da penicilina G e comum a todas as penicilinas.....	62
Figura 14. Estrutura da Ampicilina	62
Figura 15. Representação esquemática dos tipos de porosidade possíveis de serem encontradas em um corpo cerâmico.....	78
Figura 16. Corpo-de-prova submetido a uma força axial para dentro, distribuída de modo uniforme em toda área diametral da amostra.....	80
Figura 17. Distribuição de tensão e secção transversal em uma	

amostra submetida a ensaio de compressão diametral.....	81
Figura 18. Atenuação do feixe de radiação por uma solução absorvente.....	83
Figura 19. Fluxograma das etapas utilizadas para a obtenção e caracterização dos pós antes e após a sinterização.....	97
Figura 20. Molde de Teflon® - Cilindros para análise de compressão diametral.....	100
Figura 21. Corpos de prova cilíndricos 12 mm x 6 mm.....	100
Figura 22. Fluxograma das etapas utilizadas para a obtenção dos biocimentos.....	101
Figura 23. Fluxograma das etapas utilizadas para a obtenção dos biocimentos incorporados com droga.....	102
Figura 24. Aparelho de Vicat Adaptado.....	105
Figura 25. Sistema do ensaio de tração por compressão diametral.....	107
Figura 26. Curva de calibração da ampicilina.....	109
Figura 27. Difratoograma de raios X para o biocimento BC-00.....	113
Figura 28. Difratoograma de raios X para o biocimento BC-10.....	113
Figura 29. Difratoograma de raios X para o biocimento BC-30.....	114
Figura 30. Difratoograma de raios X para o biocimento BC-50.....	114
Figura 31. Espectroscopia de Infravermelho do biocimento BC-00.....	116
Figura 32. Espectroscopia de Infravermelho do biocimento BC-10.....	116
Figura 33. Espectroscopia de Infravermelho do biocimento BC-30.....	117
Figura 34. Espectroscopia de Infravermelho do biocimento BC-50.....	117
Figura 35. Morfologia referente aos biocimentos BC-00 formados por fragmentos de cristais de fosfato de cálcio.....	119
Figura 36. Análise qualitativa de elementos por espectroscopia de energia dispersiva da amostra BC-00.....	120
Figura 37. Morfologia referente aos biocimentos BC-10 formados por fragmentos de cristais de fosfato de cálcio.....	121
Figura 38. Análise qualitativa de elementos por espectroscopia de energia dispersiva da amostra BC-10.....	122
Figura 39 Morfologia referente aos biocimentos BC-30 formados por fragmentos de cristais de fosfato de cálcio.....	123

Figura 40. Morfologia referente aos biocimentos BC-50 formados por fragmentos de cristais de fosfato de cálcio.....	124
Figura 41. Tempo inicial de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	126
Figura 42. Tempo final de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	126
Figura 43. Ensaio de pH dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	131
Figura 44. Ensaio de resistência à compressão diametral dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	135
Figura 45. Fotografias de fraturas apresentadas pelas amostras de biocimento submetidas ao ensaio de compressão diametral (50X).....	138
Figura 46. Ensaio de porosidade aparente dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	139
Figura 47. Perfil de liberação de ampicilina nos biocimentos BCF-00 e BCF-10.....	143
Figura 48. Taxa de liberação de ampicilina das amostra BCF-00 e BCF-10.....	144
Figura 49. Modelo de Higuchi para as 24 horas de liberação de ampicilina da amostra BCF-00.....	145
Figura 50. Modelo de Higuchi para as 24 horas de liberação de ampicilina da amostra BCF-10.....	145
Figura 51. Modelo de Korsemeier - Peppas para as 24 horas de liberação de ampicilina da amostra BCF-00.....	146
Figura 52. Modelo de Korsemeier - Peppas para as 24 horas de liberação de ampicilina da amostra BCF-10.....	147
Figura 53. Tempo inicial de pega dos biocimentos incorporados com fármaco.....	149
Figura 54. Tempo final de pega dos biocimentos incorporados com fármaco.....	149
Figura 55. Ensaio de resistência à compressão diametral dos biocimentos incorporados com fármaco.....	152
Figura 56. Comparação entre o tempo inicial de pega dos biocimentos BC e BCF.....	155
Figura 57. Comparação entre o tempo final de pega dos biocimentos BC e BCF.....	156

Figura 58. Comparação entre a resistência à compressão diametral dos biocimentos BC e BCF.....	157
Figura 59. Espectroscopia de Infravermelho do pó precipitado em pH 8 (não sinterizado).....	186
Figura 60. Difratoograma de raios X para o pó precipitado em pH 8 e sinterizado a 1200°C.....	187
Figura 61. Micrografia óptica do pó sinterizado a 1200° C 130X).....	189

LISTA DE TABELA

Tabela 01. Fosfatos de cálcio sintéticos.....	18
Tabela 02. Constante do produto de solubilidade e razão molar Ca/P de fosfato de cálcio.....	24
Tabela 03. Fatores que afetam as propriedades das pastas de cimento.....	31
Tabela 04. Fosfatos de cálcio possíveis de serem precipitados em temperatura ambiente ou corpórea.....	33
Tabela 05. Compostos utilizados em composições de cimento.....	34
Tabela 06. Propriedades mecânicas de biocerâmicas e osso humano.....	41
Tabela 07. Posições das Bandas de Infravermelho observadas por Rehman et al., 1997.....	73
Tabela 08. Notações e organização dos dados para aplicação do método ANOVA.....	90
Tabela 09. Quadro de análise de variância (ANOVA).....	95
Tabela 10. Formulações dos biocimentos de fosfato de cálcio modificados.....	112
Tabela 11. Tempo de cura, pH, compressão diametral e porosidade dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	125
Tabela 12. Planilha de dados do tempo inicial e final de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	125
Tabela 13. Análise de Variância do tempo inicial de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	127
Tabela 14. Análise de Variância do tempo final de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	127
Tabela 15. Teste de Tukey-Kramer correspondente ao tempo inicial de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	128
Tabela 16. Teste de Tukey-Kramer correspondente ao tempo final de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	129
Tabela 17. Planilha de dados do pH dos tratamentos.....	131

Tabela 18. Análise de variância do pH dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	132
Tabela 19. Teste de Tukey-Kramer correspondente ao pH dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	133
Tabela 20. Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral dos quatro tratamentos.....	134
Tabela 21. Análise de variância da resistência à tração por compressão diametral dos quatro níveis.....	136
Tabela 22. Teste de Tukey-Kramer correspondente a resistência à compressão diametral dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	137
Tabela 23. Planilha de dados da porosidade aparente dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	139
Tabela 24. Análise de variância da porosidade aparente dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	140
Tabela 25. Tempo de pega e resistência à compressão diametral dos biocimentos incorporados com fármaco.....	148
Tabela 26. Planilha de dados do tempo inicial e final de pega dos biocimentos incorporados com fármaco.....	148
Tabela 27. Análise de Variância do tempo inicial de pega dos biocimentos incorporados com fármaco.....	150
Tabela 28. Análise de Variância do tempo final de pega dos biocimentos incorporados com fármaco.....	150
Tabela 29. Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral dos quatro tratamentos.....	151
Tabela 30. Análise de variância da resistência à tração por compressão diametral dos quatro níveis.....	153
Tabela 31. Teste de Tukey-Kramer correspondente a resistência à compressão diametral dos biocimentos incorporados com fármaco.....	154
Tabela 32. Resultados obtidos das análises por BET.....	188
Tabela 33. Resultados individuais das caracterizações físico-química dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	190
Tabela 34. Resultados individuais das caracterizações físico-química dos biocimentos incorporados com fármaco.....	191

Tabela 35. Teste de Levene correspondente ao tempo inicial de pega dos bicimentos (DCPD/ β -TCP).....	192
Tabela 36. Teste de Levene correspondente ao tempo final de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	192
Tabela 37. Teste de Levene correspondente ao pH.doas biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	193
Tabela 38. Teste de Levene correspondente a resistência à compressão diametral dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	193
Tabela 39. Teste de Levene correspondente a porosidade dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	193
Tabela 40. Teste de Levene correspondente ao tempo inicial de pega dos bicimentos incorporados com fármaco.....	195
Tabela 41. Teste de Levene correspondente ao tempo final de pega dos biocimentos incorporados com fármaco.....	195
Tabela 42. Teste de Levene correspondente a resistência à compressão diametral dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).....	195
Tabela 43. Relação entre o valor n e o mecanismo de liberação controlada.....	199

SÍMBOLOS E ABREVIações

H_3PO_4 — Ácido Fosfórico

CH_3CHCO_2HOH — Ácido Láctico

HCl — Ácido Clorídrico

α -TCP — alfa Fosfato Tricálcio

ANOVA — Análise de Variância

β -TCP — beta Fosfato Tricálcio

BC — Biocimento

BCF — Biocimento com Fármaco

BET — Brunauer, Emmet e Teller

CC — Carbonato de cálcio

CFC — Cimento de Fosfato de Cálcio

DRX — Difração de raios-X

EDX — Energia Dispersiva por Raios X

FTIR — Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

ACP — Fosfato de Cálcio Amorfo

DCPA — Fosfato Dicálcio Anidro

DCPD — Fosfato Dicálcio Di-hidratado

MCPM — Di-hidrogenofosfato de Cálcio Monoidratado

OCP — Fosfato Octacálcio

TTCP — Fosfato Tetracálcio

TCP – Fosfato Tricálcio

CDHA - Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio

NH_4OH — Hidróxido de Amônio

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ — Hidróxido de Cálcio

HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ — Hidroxiapatita

NaOH – Hidróxido de Sódio

H_0 – Hipótese Inicial

SBF — Líquido Corporal Simulado

MEV — Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia Óptica

CPP – Pirofosfato de Cálcio

pH – Potência Hidrogênionico

K_{ps} – Produto de Solubilidade

PBS - Solução Tampão de Fosfato

CSH - Sulfato de Cálcio Hemihidratado

CSD - Sulfato de Cálcio Di-hidratado

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO	1
Capítulo 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Nanotecnologia e Materiais Nanoestruturado.....	4
2.1.1 Nanopartículas – Mecanismo de Formação.....	6
2.2 Biocerâmicas Nanoestruturadas.....	10
2.3 Biomateriais.....	12
2.3.1 Biocompatibilidade e Biofuncionalidade	13
2.3.2 Aplicações dos Biomateriais.....	16
2.3.3 Cerâmicas de Fosfato de Cálcio.....	16
2.3.3.1 Hidroxiapatita-HÁ.....	18
2.3.3.2 Fosfato Tricálcio -TCP.....	20
2.3.4 Estabilidade dos Fosfatos de Cálcio.....	23
2.4 Cimentos Ósseos.....	28
2.5 Cimento de Fosfato de Cálcio (CFC).....	29
2.5.1 Cimento de DCPD (Brushita).....	34
2.6 Tecido Ósseo.....	36
2.7 Regeneração Óssea.....	41
2.8 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos.....	42
2.8.1 Principais Mecanismos de Controle da Liberação de Fármacos.....	46
2.8.2 Liberação Controlada de Agentes Ativos.....	48
2.8.2.1 Sistemas Reservatórios.....	50
2.8.2.2 Sistema Matricial.....	55
2.9 Cimentos como Veículos de Liberação de Fármacos.....	59
2.10 Antibiótico β -Lactâmicos.....	61
2.10.1 Ampicilina.....	62
2.10.1.1 Características da Ampicilina.....	63
2.11 Técnicas de Caracterização de Biomateriais.....	65
2.11.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com espectroscopia e Raios X por Dispersão de energia (MEV-EDX).....	65

2.11.2 Microscopia Óptica.....	67
2.11.3 Difração de Raios X (DRX).....	68
2.11.4 Espectrometria de Raios Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR).....	70
2.11.5 Área Superficial Especifica (BET).....	74
2.11.6 Tempo de Cura (pega) dos Cimentos de Fosfato de Cálcio.....	76
2.11.7 Resistência Mecânica.....	79
2.11.8 Espectroscopia de Absorção Óptica no Ultravioleta/Visível.....	82
2.12 Planejamento de Análise de Experimentos Fatoriais.....	85
2.12.1 Análise de Variância (ANOVA).....	87
Capítulo 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
3.1 Síntese dos Pós de Fosfato de Cálcio.....	97
3.2 Preparação de Biocimentos de Fosfato de Cálcio.....	98
3.3. Preparação de Biocimentos de Fosfato de Cálcio Impregnados com Fármaco.....	101
3.4 Caracterização dos Pós e dos Biocimentos.....	102
3.4.1 Difração de Raios-X (DRX).....	102
3.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FITIR).....	103
3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	103
3.4.4 Determinação da Distribuição do Tamanho de Partículas (BET).....	103
3.4.5 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH) dos Biocimentos.....	104
3.4.6 Tempo de Pega (Cura).....	104
3.4.7 Porosidade dos Biocimentos.....	105
3.4.8 Resistência Mecânica.....	106
3.4.9 Microscopia Óptica.....	107
3.4.10 Análise Estatística.....	107
3.4.11 Estudo da Liberação Controlada de Fármacos.....	108
3.4.12 Avaliação da Cinética de Liberação Controlada de Fármacos.....	110

Capítulo 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	111
4.1 Caracterização Físico-química.....	112
4.1.1 Resultados de Difração de Raios X (DRX).....	112
4.1.2 Resultados de Espectroscopia de Infravermelho por Tranformada de Fourier (FITIR).....	115
4.2 Caracterização Morfológica e Microestrutural.....	118
4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	118
4.3 Análise Estatística dos Biocimentos.....	124
4.3.1 Tempo de Pega.....	125
4.3.2 pH.....	131
4.3.3 Resistência à Compressão Diametral.....	134
4.4.4 Porosidade.....	138
4.5 Estudo da Liberação de Ampicilina nos Biocimentos BCF-00 e BCF-10.....	141
4.5.1 Análise Estatística dos Biocimentos Incorporados com Fármaco.....	147
4.5.1.1 Tempo de Pega.....	148
4.5.1.2 Resistência à Compressão Diametral dos Biocimentos Incorporados com Fármacos.....	151
4.6 Comparação entre os Tempos de Pega dos Biocimentos com e sem o Fármaco.....	154
4.7 Comparação entre as Resistências à Compressão Diametral dos Biocimentos com e sem o Fármaco.....	156
CAPITULO 5 - CONCLUSÕES	158
CAPITULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	160
CAPITULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
Apêndice A	186
Apêndice B	190
Apêndice C	191
Apêndice D	192
Apêndice E	195
Anexo A	197

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Desde seu surgimento no mercado, no início dos anos 80, as cerâmicas de fosfato de cálcio, especialmente a hidroxiapatita, foram consideradas os materiais por excelência para a remodelação e reconstrução de defeitos ósseos. Essa preferência se deve principalmente a suas inigualáveis propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, o que significa que ao serem implantadas no sítio ósseo, não induzem resposta imunológica; são capazes de ligar-se diretamente ao tecido ósseo e permitem o crescimento do osso ao longo de sua superfície.

Após duas décadas do início de sua aplicação clínica, surgiram registros de algumas desvantagens das cerâmicas de fosfato de cálcio. Elas podem ser encontradas nas formas de blocos ou granulados; os blocos são fabricados com formas pré determinadas e normalizadas, que nem sempre preenchem perfeitamente os defeitos; os granulados apresentam o risco de migrarem além do sítio de implantação, podendo alcançar o tecido mole e provocar reações granulomatosas e até mesmo sua expulsão para fora do organismo.

Essas desvantagens estariam ausentes se o material tivesse, além da composição similar à das cerâmicas de fosfato de cálcio, fosse moldável na forma e dimensões do defeito ósseo que se pretendesse corrigir. Estas possibilidades, e outras de interesse, são apresentadas pelos Cimentos de Fosfatos de Cálcio (CFC).

Cimentos de fosfato de cálcio (CFC) são materiais desenvolvidos há aproximadamente uma década, constituídos por um pó e um líquido, os quais, ao serem misturados formam uma pasta que endurece espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal como resultado da precipitação de um ou vários fosfatos de cálcio.

As características que tornam os CFC biomateriais interessantes para a reconstrução ou remodelação óssea são: facilidade de manipulação e moldagem, sem ter que dar forma prévia ao enxerto, adaptando-se totalmente à forma da cavidade óssea obtendo um íntimo contato entre o osso e o cimento desde os primeiros estágios da implantação. Além disso, os CFC diferenciam-se dos outros cimentos ósseos por não se aquecerem durante o processo de endurecimento, evitando assim a necrose tecidual no sítio de implantação.

Durante o uso de materiais osteocondutores, a prevenção de infecção bacteriana é um fator chave para o sucesso da operação cirúrgica, que tem como objetivo a reconstrução de defeito ósseo. Portanto, depois da cirurgia, muitas vezes, antibióticos são administrados sistematicamente aos pacientes via oral ou via intravenosa. A infecção, em particular, é um sério problema quando se usam materiais porosos. Embora a infecção bacteriana na superfície dos materiais porosos possa ser eliminada com antibióticos e/ou células imunológicas devido à circulação do fluido corpóreo, uma infecção profunda dentro do material poroso é difícil de medicar com administração de antibióticos, visto que a circulação do fluido corpóreo no poro é bastante limitada (Takechi et al., 1998).

Uma das formas de fazer uso racional e efetivo dos antibióticos é precisamente sua administração local e controlada. Isto se faz quando uma quantidade ideal de antibiótico para o tratamento está suportada por um tipo de biomaterial, o qual pode ser diferente dependendo do sítio, características da infecção, objetivos do tratamento, etc. Em particular, para lesões no osso, estes sistemas são muito efetivos. Além disso, na maioria dos casos é necessário curar a infecção antes de utilizar os procedimentos cirúrgicos de restauração ou reconstrução tecidual. No caso da liberação controlada de drogas, o tratamento da infecção e o procedimento cirúrgico podem ser feitos simultaneamente.

Quando se utilizam blocos porosos de hidroxiapatita sinterizada, estes são imersos em solução antibiótica antes do uso no processo cirúrgico (Ratier et al., 2001). Em contraste, o cimento de fosfato de cálcio não pode ser imerso na

solução antibiótica, visto que é aplicado no defeito ósseo antes de sofrer a cura ou pega. Por esta razão, a adição antibiótica ao cimento de fosfato de cálcio é importante como um suprimento de antibiótico para uso clínico. A prevenção da infecção bacteriana pode ser mais efetiva, na operação cirúrgica, empregando cimento de fosfato de cálcio do que usando blocos de hidroxiapatita, pois como já mencionado anteriormente, estes nem sempre preenchem completamente os defeitos.

O desempenho dos biocimentos pode ser melhorado através de escolhas adequadas dos materiais utilizados e dos métodos de produção adotados. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa é o desenvolvimento de um biocimento de apatitas nanométricas biocompatível e biodegradável com um fármaco incorporado. Em particular foi realizada uma avaliação das propriedades especiais dessa matriz para liberação controlada de fármaco, por meio da análise estatística de experimento fatorial com uso de softwares (Origin[®] 8).

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A fim de se obter um embasamento teórico para a realização deste trabalho, foi realizada uma revisão da literatura enfocando os seguintes pontos:

- Nanopartículas;
- Biocerâmicas;
- Tecido ósseo;
- Biocimentos;
- Liberação de fármacos.

2.1 Nanotecnologia e Materiais Nanoestruturados

As propriedades físicas e químicas de materiais em escala nanométrica são de imenso interesse e crescente importância para futuras aplicações tecnológicas.

Materiais nanoestruturados exibem, geralmente, propriedades diferenciadas com relação aos demais materiais. Muitas das aplicações destes materiais estão diretamente relacionadas às suas propriedades estruturais (Carreño et al, 2010).

O interesse por materiais nanoestruturados vem das mudanças significativas nas propriedades dos produtos obtidos, as quais estão associadas a características, tais como: grande aumento de solubilidade, enormes mudanças nas propriedades de difusão, grande estabilidade microestrutural em relação ao crescimento de grão, aumento da resistência mecânica em materiais frágeis, diminuição no tamanho de falhas, super

plasticidade e otimização de propriedades magnéticas. Estas melhorias são encontradas em casos específicos e estão longe de ser uma regra geral (Carreño et al., 2008).

O campo da nanotecnologia é muito amplo e interdisciplinar promovendo o envolvimento de diversas áreas do conhecimento como, por exemplo, a física, a química, a biofísica, a bioquímica, além da ciência de materiais, da ciência da computação e da medicina. Entretanto, apenas uma parte deste campo, na qual está inserida a ciência de materiais, se concentra na criação de novas estruturas com novas propriedades (Murray et al., 2000).

A nanotecnologia pode ser entendida como sendo o termo utilizado para descrever a criação, manipulação e exploração de materiais em escala nanométrica (Dowling, 2004). É a ciência utilizada para investigação de materiais nanoestruturados, constituídos por átomos e/ou moléculas. O termo nano vem do grego e significa *anão*. O nanômetro corresponde à bilionésima parte de um metro, ou à divisão do metro em um bilhão de partes, ou seja, 1nm é igual a 10^{-9} m.

O controle adequado das propriedades dos nanomateriais pode levar à geração de um grupo promissor de materiais avançados, novos produtos, dispositivos, tecnologias e sistemas funcionais que possibilitem potenciais aplicações em diversos setores, inclusive na indústria (Rao et al., 2001). Em áreas como medicina, indústrias farmacêutica e biomédica, as nanopartículas funcionalizadas poderão ser úteis para viajarem no corpo humano a fim de reparar tecidos danificados. Ainda nesta área, outros materiais nanoestruturados, podem ser usados como base para novos fármacos, conjunto para auto-diagnósticos, etc. (Marzán, 2004). Nanomateriais podem ser aplicados ainda, em detecção biológica, distribuição controlada de drogas, filtros ópticos, sensores, entre outras.

O fascínio e o crescente interesse que os materiais nanoestruturados despertam nos pesquisadores que trabalham em ciências de materiais e áreas afins, podem ser atribuídos ao fato de que esses materiais, no estado sólido, apresentam propriedades físicas, químicas e estruturais, qualitativa e

quantitativamente, diferentes das encontradas nos materiais volumares (*bulk*) das espécies das quais eles são derivados (He, et al., 2001).

Com o avanço da ciência, muitas técnicas de síntese de nanopartículas e excelentes ferramentas de caracterização e manipulação destas, tornaram-se disponíveis. Este fato tem levado a um grande avanço em pesquisas, utilizando materiais outrora inacessíveis, proporcionando aos pesquisadores a oportunidade de escolher qual a melhor rota de síntese a ser utilizada na produção desses materiais. Entretanto, a escolha de uma rota mais adequada a ser seguida na produção de nanopartículas está diretamente relacionada às características que se deseja obter das amostras produzidas e às aplicações pré-definidas para estes materiais.

Assim, entender o mecanismo de formação de nanopartículas é extremamente importante, além da escolha do método de síntese. Isto porque a maioria dos estudos relacionados a esses materiais requer que as amostras apresentem características ideais, como estreita distribuição de tamanho de partículas e morfologia controlada. Diante disso, apresenta-se, a seguir, uma descrição sobre os mecanismos de formação de nanopartículas, onde estão envolvidas as etapas de nucleação e crescimento. Estas etapas são muito importantes na construção e produção de materiais nanoestruturados por meio de reações químicas, uma das rotas de síntese mais utilizadas na fabricação de nanopartículas.

2.1.1 Nanopartículas - Mecanismos de Formação

Embora ainda não se conheçam completamente os mecanismos que contribuem para a formação e o crescimento de nanopartículas, devido à sua complexidade, é indispensável estudar as etapas de nucleação e crescimento e assim alcançar a habilidade de controlar sua distribuição de tamanho (He, 2001).

Muitas rotas podem ser usadas na preparação de partículas

nanométricas. As reações químicas em solução são mais comuns e tem se desenvolvido significativamente. Dentre estas reações, está a síntese por precipitação (formação de um sólido), na qual processos como nucleação, crescimento e aglomeração das partículas ocorrem simultaneamente (Cushing et al., 2004).

Devido à dificuldade de isolar cada um dos processos envolvidos nas reações de precipitação para estudá-los separadamente, seus mecanismos fundamentais não são conhecidos completamente. A teoria que envolve essas reações não é um assunto muito fácil, entretanto podem-se resumir as suas principais características como a seguir (Cushing et al, 2004):

- Os produtos das reações de precipitação são geralmente espécies pouco solúveis sob condições de supersaturação; estas condições determinam que a nucleação seja uma etapa fundamental nessas reações e que um grande número de partículas pequenas será formado;
- Processos secundários, como amadurecimento de Ostwald (fenômeno pelo qual partículas muito pequenas são essencialmente consumidas pelas partículas maiores, durante o processo de crescimento) e agregação, afetarão significativamente o tamanho, a morfologia e as propriedades dos produtos;
- As condições de supersaturação fundamentais para induzir a precipitação são comumente o resultado de reações químicas. Dessa maneira, quaisquer condições de reação (ex.: taxa de adição de reagentes, tipo de redutor, uso de estabilizante e taxa de agitação) podem influenciar o processo de mistura e podem ser relevantes no controle do tamanho, morfologia e distribuição de tamanho da partícula.

Uma das condições para se utilizar uma amostra em vários estudos e em possíveis aplicações é que esta apresente distribuição de tamanho monodispersa. Entretanto, as condições determinantes para que os produtos de reação sejam nanoparticulados e/ou monodispersos dependem

fundamentalmente dos processos de nucleação e crescimento que controlam o tamanho e a morfologia do sólido que será formado (Cushing et al, 2004).

Para entendermos melhor como se dão as etapas de nucleação e crescimento, consideremos uma reação química por precipitação. Quando a precipitação começa, um grande número de cristalitos (núcleos) é formado inicialmente (etapa de nucleação), mas estes tendem a se agregar de forma rápida para constituir cristais maiores e mais estáveis termodinamicamente (etapa de crescimento). No que se refere à etapa de nucleação, o grau de supersaturação é a chave para qualquer processo de precipitação. É conhecido que a etapa de nucleação pode ocorrer de duas maneiras: nucleação homogênea e nucleação heterogênea.

O processo de nucleação homogênea envolve uma transformação de fase e a criação de uma interface entre as duas fases (líquida e sólida). Neste processo, um pequeno número de íons se reúne para formar um sólido, o embrião. Íons são adicionados e subtraídos do embrião aleatoriamente; à medida que o embrião cresce sua energia livre inicialmente aumenta devido ao aumento de energia superficial. Assim, somente poucos embriões entre os muitos formados continuam a crescer. Eventualmente, um tamanho crítico de embrião é alcançado, além do qual a energia livre decresce com o aumento do tamanho, pois a razão superfície-volume diminui o suficiente para vencer a influência da energia superficial (Costa, 1988).

Na nucleação homogênea, não se considera a influência de outros sólidos além da fase precipitante. Entretanto, na prática, o efeito de impurezas é bastante pronunciado. A presença de impurezas no meio precipitante catalisa a nucleação no sentido em que esta se inicia em um nível de supersaturação mais reduzido do que o necessário na ausência desses elementos estranhos. As impurezas oferecem superfícies nas quais as espécies químicas podem adsorver e, quer por difusão na superfície originar a formação de um núcleo superficial, quer em sítios ativos presentes iniciar o crescimento. Este tipo de nucleação é denominado de nucleação heterogênea (Costa, 1988).

A nucleação heterogênea ocorre em um grau de supersaturação mais

reduzido do que aquele exigido para a nucleação homogênea. Assim, este último processo é verificado somente se uma considerável supersaturação for usada. A relação entre a supersaturação inicial e o número final de partículas é crucial para a diferenciação dos processos de nucleação homogênea e heterogênea.

Quanto à etapa de crescimento das partículas, a difusão é o principal fator dominante deste processo. Quando um novo material é adicionado à superfície da partícula, gradientes de concentração e temperatura são fatores predominantes que determinam a velocidade da reação. A formação de um núcleo estável, através de colisões entre os vários átomos é possível desde que um número crítico desses átomos esteja presente no meio reacional. A probabilidade de colisão entre o átomo e o núcleo já formado é muito maior que a probabilidade de nucleação. Uma vez os núcleos já formados, o processo de crescimento ocorre mais rapidamente do que a nucleação (Chen et al., 2002). A etapa de nucleação na síntese de nanopartículas, através de precipitação, deve ser relativamente rápida e a de crescimento relativamente lenta (Oliveira et al., 2005).

A primeira condição que deve ser cumprida para se obter partículas monodispersas é que as etapas de nucleação e crescimento ocorram separadamente (Viau et al., 1996). Dessa maneira, reações de precipitação homogênea são comumente utilizadas na preparação dessas partículas.

De maneira geral, em rotas químicas para a preparação de nanopartículas, as etapas de nucleação e crescimento são muito importantes na formação desses materiais. Neste sentido, a escolha dos precursores, meio reacional e condições de síntese serão determinantes nas características dos materiais que serão obtidos.

2.2. Biocerâmicas Nanoestruturadas

As biocerâmicas nanoestruturadas são materiais sólidos inorgânicos quimicamente inertes, constituídos, de uma maneira geral, de uma ou mais fases descontínuas dispersas dentro de uma fase contínua, tendo a fase descontínua dimensões inferiores a 150 nm (Gleiter, 1994).

Somente com o desenvolvimento da nanotecnologia pode-se elaborar pós biocerâmicos nanoestruturadas constituídos de fosfato de cálcio, com melhores propriedades mecânicas (Cunha et al., 2006). Estes estudos são temas de pesquisa em diferentes laboratórios, principalmente por esses materiais apresentarem boas características de biocompatibilidade, elevada área específica e pela semelhança mineralógica da estrutura óssea e dental.

Numerosos estudos tem sido desenvolvidos sobre obtenção de biomateriais nanoestruturados, principalmente os trabalhos relacionados à síntese de pós biocerâmicos nanoestruturados de fosfato de cálcio. Isto se deve a estas biocerâmicas auxiliarem na regeneração do tecido ósseo e sua biodegradação acelerada no caso de pós nanoestruturados, devido a alta área específica dos pós. Diferentes métodos de síntese vem sendo utilizados na produção de pós nanoestruturados, sempre procurando obter partículas com tamanho nanométrico, visando uma superfície de área elevada, em razão destas características serem importantes em estudos de regeneração e reconstituição do tecido ósseo (Delima et al., 2007).

As biocerâmicas nanoestruturadas de fosfato de cálcio, se destacam em aplicações médico-odontológicas. Na área médica, podem ser utilizadas na reconstituição óssea para recuperação de pacientes que sofreram acidentes automobilísticos graves, de trabalho ou mesmo domésticos graves, também é utilizado no tratamento da osteoporose (fragilidade nos ossos devido à dificuldade de retenção de cálcio), osteomielite (um tipo de infecção óssea), na liberação de medicamentos e drogas anti-câncer (Rauschmann et al., 2004).

Devido às distintas propriedades e formas que podem apresentar, as biocerâmicas podem ser aplicadas em inúmeras partes do corpo humano conforme Figura 01.

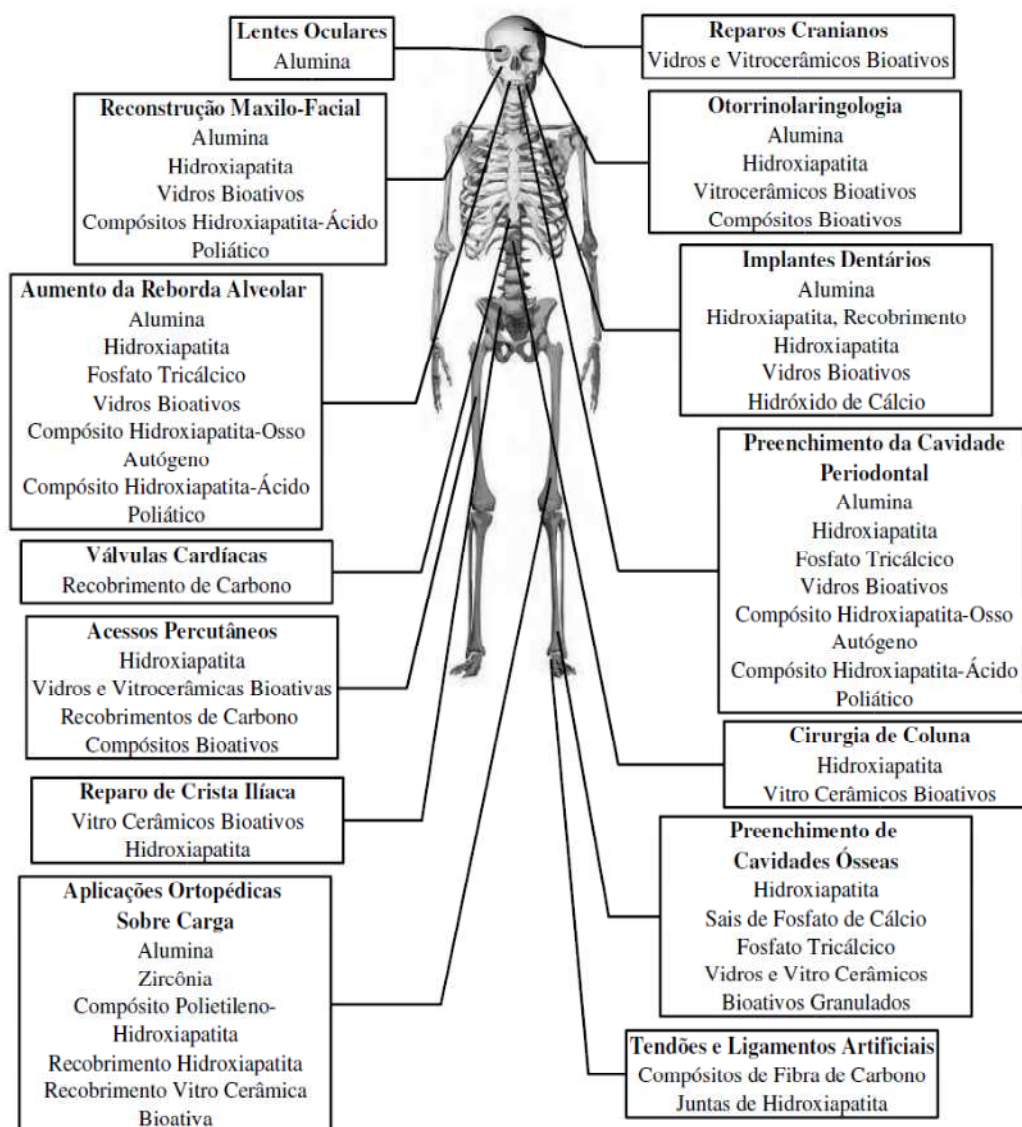


Figura 01. Aplicações clínicas das biocerâmicas no esqueleto humano (Santos, 2002).

2.3. Biomateriais

Biomateriais são utilizados desde o tempo em que o homem dava os primeiros passos na medicina e na odontologia, mas somente depois da Segunda Guerra Mundial houve um avanço significativo neste ramo da engenharia dos materiais. Devido à necessidade de se utilizar um material dentro do corpo humano na forma de implante e/ou enxerto e, ao mesmo tempo, classificá-lo na área médica, algumas definições para biomateriais têm sido utilizadas. Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origens naturais ou sintéticas que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo (Mirtchi et al., 1989), ou ainda como um material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos (Williams, 1987).

De um modo geral, o termo biomateriais compreende qualquer substância ou combinação de substâncias que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas por qualquer que seja o período de tempo, como parte ou como o todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgão ou funções do corpo humano (Williams, 1999). Isso significa que, no sentido mais amplo, são enquadrados nessa categoria todos os materiais empregados na medicina, odontologia, medicina veterinária e farmacologia, além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com tecidos do corpo. Uma definição prática é dada por Park (1979) segundo a qual "Biomateriais é tudo que, de modo contínuo ou intermitente, entra em contato com fluidos corpóreos, mesmo que esteja localizado fora do corpo". Assim, pinos, placas de fixação externas, bisturis, lâminas e demais instrumentos cirúrgicos não são considerados biomateriais; apenas os fios que entram no corpo humano são biomateriais. Atualmente são usados mais de 40 tipos para reconstituição e substituição de componentes do corpo humano (Pereira, 2000). Segundo a definição de Williams os biomateriais

podem ser naturais ou sintéticos. Um enxerto de osso autógeno ou alógeno é um exemplo de biomaterial natural.

Os biomateriais podem ser: metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos. Enxertos de materiais compósitos bioativos – combinação de biocerâmicas e biovidros, biocerâmicas e fibras poliméricas, unem características de classes diferentes de materiais para tornar o biomaterial adequado a determinados tipos de aplicação.

2.3.1 Biocompatibilidade e Biofuncionalidade

Biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízos ao organismo a curto e longo prazo. Para que um material seja aceito clinicamente como um material de implante, ele precisa atender a alguns requisitos fundamentais (Hench & Wilson, 1993) :

- O material deve ser biocompatível, ou seja, sua presença não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico;
- Os tecidos não devem causar a degradação do material, como, por exemplo, corrosão em metais, a não ser de forma tolerável;
- O material deve ser biofuncional, ou seja, deve ter as características adequadas para cumprir a função desejada, pelo tempo desejado;
- O material deve ser esterilizável.

Com o aumento do número de materiais utilizados como biomateriais e os diversos aspectos envolvidos na interação com os tecidos vivos, têm-se procurado classificá-los em diversos grupos. De uma forma geral, os biomateriais podem ser classificados em função do comportamento fisiológico e em função da sua natureza e origem (Hench & Wilson, 1993):

➤ **Materiais Bioinertes**

São materiais menos susceptíveis de provocar uma reação biológica adversa ao organismo, por serem quimicamente estáveis. As cerâmicas bioinertes são definidas como sendo materiais que apresentam resposta interfacial mínima, que não resulta na ligação nem na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa ao redor do material. Como exemplos de biocerâmicas bioinertes podemos citar a alumina (Al_2O_3), zircônia (ZrO_2) e dióxido de titânio (TiO_2).

➤ **Materiais Bioreativos**

Os metais utilizados em ortopedia e em implantodologia dominam essa classe de materiais. No entanto, a maioria dos biomateriais metálicos não é bioreativo, ficando mais próxima à classe dos materiais bioinertes. Os metais classificados como bioreativos ficam no limite entre os materiais bioinertes e os bioativos. Esses metais adquirem bioatividade após um tratamento de ativação de superfície do seu óxido. São eles o titânio, o nióbio e o tântalo (Prado da Silva, 2002a).

➤ **Materiais Bioativos**

O termo bioatividade é definido como sendo a propriedade de formar apatita espontaneamente, “*in vivo*” ou “*in vitro*” sobre a superfície de um biomaterial e estabelecer uma interface capaz de suportar cargas funcionais (Prado da Silva, 2002a). O material bioativo permite uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo, possibilitando a formação de uma ligação entre o tecido e o próprio material (Kokubo, 1990). Neste caso, o tecido é capaz de interagir intimamente com o material depositando-se diretamente

sobre a superfície do mesmo sem a intervenção da camada de tecido fibroso. A natureza dessa ligação osso-implante, no caso destes materiais parece ser do tipo químico, sendo que nessa ligação o papel fundamental parece ser feito pelos componentes orgânicos e minerais presentes no fluído do corpo humano. Os testes de bioatividade são realizados através da imersão do biomaterial em uma solução com concentrações iônicas semelhantes as do plasma humano, a 37⁰C, denominada líquido corporal simulado (SBF) (Prado da Silva, 2002b).

As cerâmicas bioativas podem ser utilizadas na regeneração óssea em geral, inclusive nos tratamentos odontológicos como carreadoras de fármacos. Essa classe de biocerâmicas pode ser produzida de várias formas, para atender a diferentes funções de reparo dos ossos. Os grânulos, por exemplo, são usados para preencher espaços e participar do processo de regeneração do tecido ósseo. As biocerâmicas porosas são utilizadas na reconstituição de defeitos ósseos mais extensos onde haja necessidade de alguma função estrutural (Prado da Silva, 1999; Hulbert et al.,1987). Cabe ressaltar que as biocerâmicas não têm tenacidade à fratura suficientemente elevada para cumprir as funções estruturais dos biomateriais metálicos. Em algumas aplicações, recobrimentos cerâmicos são utilizados sobre implantes metálicos. Obtém-se, dessa forma, a função estrutural do biomaterial metálico e bioatividade do recobrimento biocerâmico bioreabsorvíveis.

O desenvolvimento de materiais considerados bioativos e bioreabsorvíveis é enfatizado já que, além de substituir tecidos traumatizados, estes materiais também podem propiciar a recuperação do tecido danificado através da atuação em metabolismos intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento.

2.3.2. Aplicação dos Biomateriais

O número de pacientes nos hospitais em função principalmente da ocorrência de osteoporose e de acidentes oriundos de trabalho, transportes e esportes tem incentivado o desenvolvimento de materiais que possam ser utilizados como próteses e implantes no corpo humano. Em diversas situações, os biomateriais podem ser úteis para reconstituição ou substituição de tecidos naturais do corpo. Entretanto, nem sempre o organismo aceita os materiais implantados, o que preocupa os médicos e faz com que muitos pacientes voltem à mesa de cirurgia.

De um modo geral, a aplicação dos biomateriais ocorre nos mais diversos campos da medicina como por exemplo, prótese em ortopedia ou cirurgia cardiovascular (válvulas cardíacas), órgãos artificiais, materiais para reparação de tecido ósseo (implantes endósseos), dispositivos cirúrgicos, sistemas de liberação controlada de fármacos, recobrimento de materiais metálicos e nos compósitos bioativos que nada mais são que a combinação de uma biocerâmica, na forma de partículas ou fibras, com um material polimérico, potencializando suas características para torná-lo adequado a determinados tipos de implante (Elliot, 1994).

2.3.3. Cerâmicas de Fosfato de Cálcio

Cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas, por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica no organismo, ausência de inflamações, e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro. Elas foram propostas em 1920 para aplicações biomédicas, uma vez que o fosfato tricálcico, quando injetado nos defeitos ósseos, demonstrou crescimento ósseo mais rápido do que nos defeitos não tratados (Ben-Nissan, 2002).

Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química

destes materiais que, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica (Kawashi, 1997).

As biocerâmicas de fosfatos de cálcio continuam sendo pesquisadas e cada vez mais são utilizadas em procedimentos para a reconstrução e recomposição tecidual óssea. A descoberta por cientistas de que a fase mineral dos ossos e dentes consistia de sais de fosfato de cálcio motivou pesquisas sobre o uso desses sais obtidos em laboratório como material útil na consolidação de fraturas ósseas. Entretanto, somente quando foram desenvolvidas as técnicas de conformação de materiais cerâmicos, ao redor de 1960, é que a utilização dos fosfatos de cálcio como biomateriais foi consolidada. A semelhança química com a fase mineral dos ossos e dentes, a excelente biocompatibilidade com o meio fisiológico e as fortes ligações com o tecido ósseo são fatores que têm estimulado a aplicação dos fosfatos de cálcio sintéticos como biomateriais. Essas biocerâmicas não induzem qualquer reação imunológica ou tóxica indesejável. Não apresentam riscos de transmissão de patologias infecto-contagiosas nem de degradação protéica, em razão de suas características e por apresentarem alta pureza em decorrência de seu processo de obtenção com rígido e sistemático controle de acordo com os padrões exigíveis. A Tabela 01 mostra vários tipos de fosfato de cálcio sintéticos.

Tabela 01. Fosfatos de cálcio sintéticos (Ferraz, 2000).

Razão Ca/P	FÓRMULA QUÍMICA	NOME
2,0	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	<i>Fosfato tetracálcio</i>
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ $\text{Ca}_{10-2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	<i>Hidroxiapatita</i> <i>Fosfato de cálcio amorfo</i>
1,50	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	<i>Fosfato tricálcio</i>
1,33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	<i>Fosfato octacálcio</i>
1,0	$\text{CaH PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Fosfato dicálcio dihidratado</i>
1,0	CaHPO_4	<i>Fosfato dicálcio</i>
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	<i>Pirofosfato de cálcio</i>
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Pirofosfato de cálcio dihidratado</i>
0,7	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	<i>Fosfato heptacálcio</i>
0,67	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	<i>Fosfato dihidrógeno tetracálcio</i>
0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	<i>Fosfato monocálcio monohidratado</i>
0,5	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	<i>Metafosfato de cálcio</i>

2.3.3.1 Hidroxiapatita - HA

Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com razão molar Ca/P igual a 1,67 é sem dúvida, a mais estudada e a mais utilizada para as finalidades clínicas por ser o principal componente na fase mineral dos ossos (Van Blitterswijk, 1985). Em consequência disto, ela possui propriedades de biocompatibilidade e bioatividade, até o momento não são alcançadas por nenhum outro material (Layman, 1998). Contudo, a baixa resistência à tração e à fadiga dessas cerâmicas tem limitado sua aplicação como implantes em locais que sofrem solicitações mecânicas baixas ou somente esforços compressivos (Rigo et al., 1999). Cerâmicas de hidroxiapatita são produzidas em solução neutra ou alcalina (Lavernia et al., 1991).

O uso clínico da hidroxiapatita, por outro lado, é limitado devido à sua lenta biodegradação (Jarcho, 1992). Entretanto, a biodegradação da hidroxiapatita é variável e depende de: (De Groot, 1980):

- Dissolução físico-química, que reduz o tamanho do implante;
- Partículas muito pequenas podem ser dissolvidas ou desintegradas pelo primeiro fenômeno, ou digeridas intracelularmente por células fagocitárias;
- Cristalinidade: quanto mais cristalina, mais estável e menos reabsorvível;
- Estequiometria e substituições: quanto mais estequiométrica, mais estável e menos reabsorvível. Algumas substituições iônicas tornam a hidroxiapatita mais reabsorvível. Como exemplo, as substituições de grupos carbonato (CO_3^{2-}) tornam as apatitas mais reabsorvíveis.

Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após quatro ou cinco anos de implantação (Liu et al., 2000). A reabsorção é uma característica desejada em alguns tipos de enxertos, onde deve haver degradação com a reposição do osso em formação. Conseqüentemente, as biocerâmicas de hidroxiapatita encontram as seguintes aplicações clínicas:

- Pó cerâmico para preenchimento de cavidades ósseas;
- Pequenos implantes a exemplo do ossículo do ouvido médio;
- Recobrimentos sobre implantes dentários metálicos;
- Implantes porosos submetidos a baixo carregamento onde o crescimento do osso para dentro dos poros atua como uma fase de reforço;
- Fase bioativa de um compósito polímero-cerâmica bioativa;
- Base para compósitos biovidro/hidroxiapatita.

A hidroxiapatita é formada por átomos dos elementos químicos: cálcio, fósforo, oxigênio e hidrogênio. Os grupos fosfatos e hidroxila, juntamente com o cálcio, distribuem-se espacialmente segundo um arranjo em forma hexagonal (Figura 02). Uma das características dessa estrutura é que ela permite que os

grupos hidroxila (OH^-) sejam retirados com relativa facilidade, gerando canais vazios entre os hexágonos formados pelos íons de cálcio. Esses canais podem conduzir íons e moléculas, para dentro da estrutura do material cerâmico.

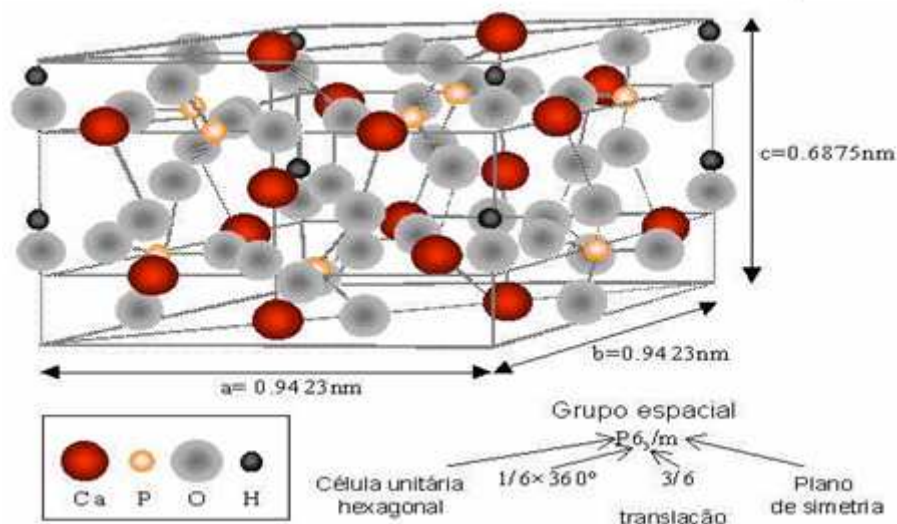


Figura 02. Estrutura do cristal hidroxiapatita (McGregor, 1998).

A célula unitária da hidroxiapatita tem seis grupos PO_4^{3-} e dois grupos OH^- . O arranjo atômico na célula unitária mostra organização espacial de átomos Ca, tetraedros de PO_4^{3-} e grupos OH^- com respeito a cada um.

2.3.3.2 Fosfato Tricálcio - TCP

O fosfato tricálcico (TCP), tem sido intensamente investigado para fins de enxertos biocerâmicos, devido a sua característica de ser bioabsorvível. Podem ser obtidos por diferentes técnicas de síntese e os seus politipos também são considerados como TCP, com fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Este material possui três fases polimórficas (Elliot, 1994, Ryu et al., 2002) :

- Quando apresenta simetria romboédrica, é definido como fosfato tricálcio do tipo β (β -TCP), estável até temperaturas próximas a 1180°C ;

- Uma fase monoclinica, estável na faixa de temperatura entre 1180 a 1430°C chamada de fase alfa (α -TCP);
- Uma fase de alta temperatura (acima de 1430°C), denominada de super-alfa ou alfa' (α' -TCP).

O controle da quantidade relativa de fases durante o processo de produção de biocerâmicas sintéticas permite a produção de materiais mais ou menos reabsorvíveis (Johnson, 1987).

A absorção ou biodegradação do fosfato tricálcico, como dos outros fosfatos de cálcio, depende basicamente de três fatores:

1. Dissolução físico-química, que depende da solubilidade do material e o pH do ambiente onde o material se encontra;
2. Desintegração física, na qual o material é feito em pequenas pelo ataque químico preferencial nos contornos de grão;
3. Fatores biológicos, como a fagocitose, que causa mudanças locais na concentração de pH do meio.

Dentre os polimorfos do fosfato tricálcio, a fase que tem despertado maior interesse para utilização em enxertos biocerâmicos é o β -TCP, pois o mesmo, dentre as três fases, é a que possui estabilidade química, resistência mecânica e taxa de bioabsorção mais adequadas a este tipo de aplicações (Elliot, 1994, Ryu et al., 2002). Embora a maioria dos autores concorde que seu cristal seja romboédrico, ou seja, com as dimensões do cristal $a = b = c$, alguns trabalhos citam as medidas de $a = 10,43 \text{ \AA}$ e $c = 37,37 \text{ \AA}$, como indicado na Figura 03. O cristal apresenta imperfeições na estrutura que levam a grande instabilidade. Mesmo assim é caracterizado por difração de raios X (DRX) (Okazaki et al., 1990). O tamanho das partículas e suas propriedades variam de acordo com os parâmetros de síntese (Oliveira, 2004).

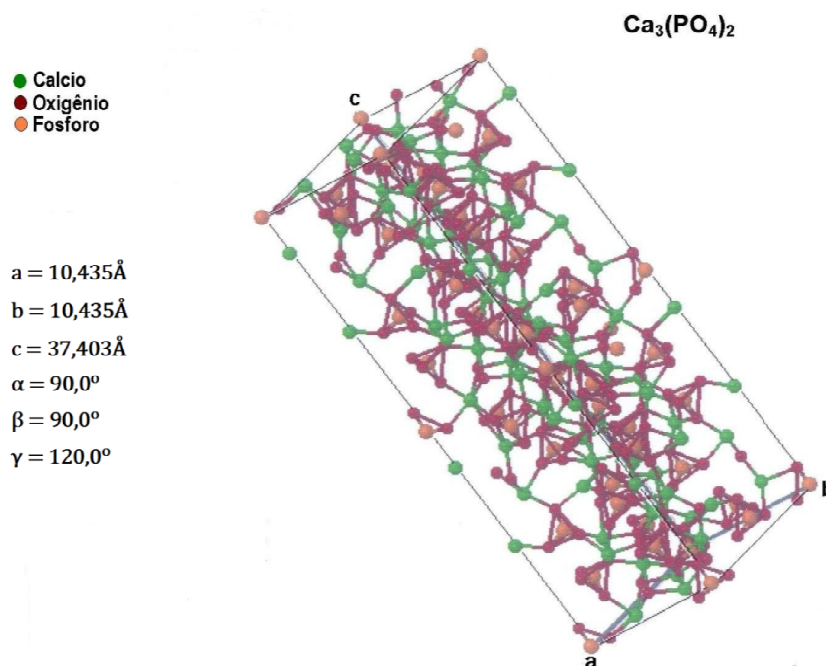


Figura 03. Estrutura do cristal β - fosfato tricálcio (Bases de dados – CAPES, 2010).

A taxa de absorção é uma característica importante, pois a mesma deve ser adequada à velocidade com a qual os tecidos são reconstruídos. A taxa de absorção do α -TCP é maior que a do β -TCP, e este último, por sua vez, possui uma taxa muito maior quando comparada à da hidroxiapatita. De maneira geral, a taxa de bioabsorção aumenta com o aumento da área superficial, diminuição da cristalinidade e do tamanho de grão. Então, de acordo com uma determinada aplicação, pode-se selecionar a fase desejada e o método de processamento no qual se obtenha uma microestrutura que permita que o fosfato tricálcio tenha a taxa de bioabsorção mais adequada com a reposição dos tecidos (Ratner et al., 1996; Kawachi et al., 2000).

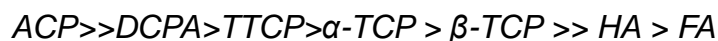
O β -fosfato tricálcico, apesar ter um grande potencial de aplicação como material para enxertos biocerâmico, apresenta uma limitação em seu processamento, que está relacionada à temperatura relativamente baixa de transformação para a fase polimórfica α -TCP, que ocorre por volta de 1180°C . Quando se processa o TCP a temperaturas superiores à temperatura em que

ocorre esta transformação polimórfica, ocasionam-se defeitos (trincas) na estrutura do material, reduzindo, assim, a sua resistência mecânica (Gibson et al., 1996; Ryu et al., 2002; Enderle et al., 2005).

Ao sofrer a transformação polimórfica da fase beta (β) para a fase alfa (α), o fosfato tricálcio passa de uma estrutura romboédrica, cuja densidade é aproximadamente $3,07 \text{ g/cm}^3$, para uma estrutura monoclinica (densidade igual $2,87 \text{ g/cm}^3$), ocorrendo uma expansão de sua estrutura. Devido a esta diferença de volume ao passar da fase alfa para beta, gera-se uma tensão dentro da estrutura do material, o que ocasionará uma série de microtrincas na estrutura do mesmo (Elliot, 1994; Enderle et al., 2005).

2.3.4 Estabilidades dos Fosfatos de Cálcio

A dissolução *in vitro* dos fosfatos de cálcio depende, dentre outros fatores, do pH, da concentração e do grau de saturação da solução tampão, da composição e cristalinidade dos fosfatos de cálcio. A ordem de solubilidade de alguns dos fosfatos de cálcio é a seguinte (LeGeros, 1991):



onde:

- *ACP* (Fosfato de cálcio amorfo)
- *DCPA* (Fosfato dicálcio anidro)
- *TTCP* (Fosfato tetracálcio ($\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$))
- $\alpha\text{-TCP}$ (alfa-Fosfato tricálcio)
- $\beta\text{-TCP}$ (beta-Fosfato tricálcio)
- *HA* (Hidroxiapatita)
- *FA* (Fluorapatita)

Esta ordem de solubilidade concorda com os valores de K_{ps} apresentados na Tabela 02, a seguir:

Tabela 02. Constante do produto de solubilidade e razão molar Ca/P de fosfato de cálcio (Chow et al., 1991).

Composto	Fórmula	Ca/P	$\log K_{ps}(25^\circ)$	$\log K_{ps}(37^\circ)$
Fosfato monocálcio monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	Muito solúvel	-
Fosfato monocálcio Anidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5	Muito solúvel	-
Fosfato dicálcio Dihidratado - Brushita (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	6,59	6,63
Monetita, fosfato dicálcio anidro (DCPA)	CaHPO_4	1,0	6,90	7,02
Fosfato octacálcio, (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	96,6	95,9
α -Fosfato tricálcio, (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	25,5	25,5
β -Fosfato tricálcio, (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	28,9	29,5
Hidroxiapatita, (HÁ)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	58,4	58,6
Fluorapatita, (FA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1,67	60,5	-
Fosfato tetracálcio, (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0	38 a 4	42,4

A solubilidade é uma das mais importantes propriedades dos compostos de fosfato de cálcio: ela determina a direção de todas as reações químicas à temperatura ambiente, nas quais os fosfatos de cálcio estão envolvidos. O parâmetro mais importante para a descrição das propriedades de solubilidade de um sal de fosfato de cálcio é a constante de produto de solubilidade

termodinâmica, K_{ps} , uma quantidade relacionada à energia livre de Gibbs do sólido, sendo expressa na forma relacionada à fórmula do composto. Por exemplo, para a hidroxiapatita (HA):

$$K_{ps}(HA) = (Ca)^5 PO_4^3 (OH) \quad eq. (01)$$

onde, as quantidades em parêntese do lado direito da equação denotam atividades.

Com base na regra das fases de Gibbs, um sistema ternário com duas fases, um líquido e um sólido, em equilíbrio em uma determinada temperatura e pressão tem grau de liberdade um. Assim, uma linha, conhecida como isoterma de solubilidade, no diagrama de fases, define a composição de todo líquido que está saturado em relação ao sal. A isoterma de solubilidade de um sal de fosfato de cálcio pode ser calculada com base no conhecimento da constante do produto de solubilidade, nas constantes de dissociação do ácido fosfórico e do hidróxido de cálcio, nas constantes de estabilidade dos pares iônicos e num modelo apropriado para calcular os coeficientes de atividade das espécies envolvidas. A Figura 04. apresenta as isotermas calculadas a 37°C de sete sais de fosfato de cálcio (Chow, 1991): fosfato dicálcio dihidratado (DCPD), fosfato dicálcio anidro (DCPA), fosfato octacálcico (OCP), β -fosfato tricálcico (β -TCP), α -fosfato tricálcico (α -TCP) e hidroxiapatita (HA) na forma do logaritmo da concentração total de cálcio, $\log[Ca]$, da solução saturada em função do pH. A Figura 05 mostra as isotermas dos mesmos compostos na forma do logaritmo da concentração total de fósforo, $\log[P]$, da solução saturada em função do pH.

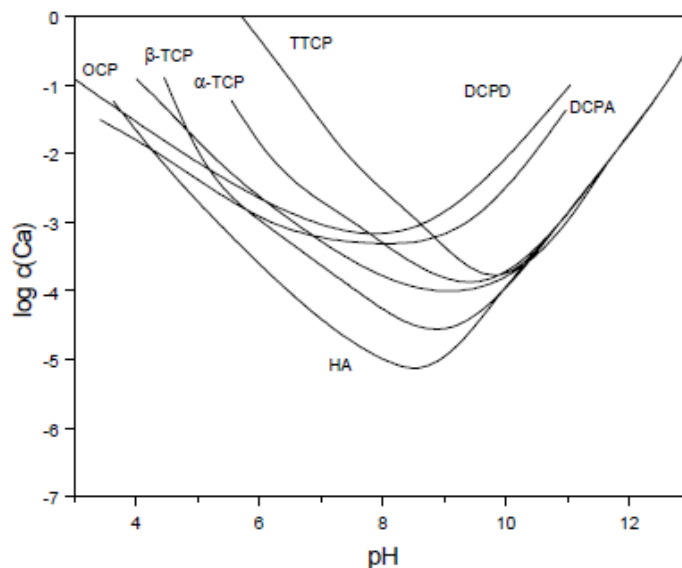


Figura 04. Diagrama de solubilidade para o sistema ternário $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C . (a) isotermas de solubilidade mostrando $\log [\text{Ca}]$ e pH de soluções em equilíbrio com vários sais (Chow et al., 1991).

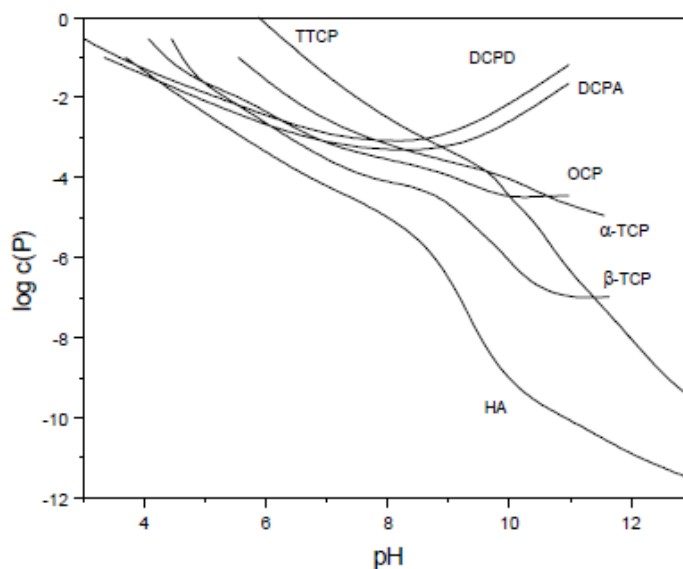


Figura 05. Diagrama de solubilidade para o sistema ternário $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C . (b) isotermas de solubilidade mostrando $\log [\text{P}]$ e pH das soluções (Chow et al., 1991).

As isotermas em ambas as figuras têm inclinação negativa nas regiões neutras e ácidas, ou seja, pH abaixo de 7, do diagrama de fase. Isso reflete o fato de que todos os compostos são mais solúveis conforme o pH diminui. A inclinação da isoterma é uma indicação do quão rapidamente a solubilidade dos sais aumenta com a diminuição do pH. Desde que, para um dado aumento no pH, a solubilidade de um sal básico aumenta mais do que a de um sal ácido, a inclinação da isoterma é correlacionada à basicidade do sal. Por exemplo, os sais ácidos, DCPD e DCPA, têm inclinações negativas menores do que a dos sais básicos, TTCP, HA e os dois TCPs.

Na região alcalina do diagrama de fases, a concentração de Ca aumenta com o aumento do pH (Figura 04) mas, com exceção de DCPA e DCPD, a concentração de P diminui com o aumento do pH (Figura. 05). As razões para as diferentes formas das isotermas $\log [P]$ versus pH são também relacionadas à basicidade do composto como descrito anteriormente. Podemos concluir que a solubilidade do sal de fosfato de cálcio é determinada, principalmente, por dois fatores: a constante termodinâmica do produto de solubilidade e a basicidade do composto.

Os diagramas de solubilidade mostrados nas Figuras 04 e 05 são úteis porque revelam a estabilidade relativa dos sais em vários valores de pH. Em um dado pH, um sal cuja isoterma se encontra abaixo de uma de outro sal é menos solúvel (mais estável) do que o outro. Assim, é claro, a partir do diagrama, que, a 37°C, a HA é o menos solúvel de todos os sais, ainda que o pH caia abaixo de aproximadamente 4,2, em que o DCPA torna-se o menos solúvel. Similarmente, o TTCP é o mais solúvel, para pH abaixo de 8,5; acima desse valor o DCPD é o mais solúvel. As estabilidades relativas de vários sais são a maior força motriz para as reações que ocorrem nos cimentos de fosfato de cálcio.

Os diagramas de fase mostrados nas Figuras 04 e 05 aplicam-se apenas ao sistema $\text{Ca(OH)}_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$. Isso significa que as composições descritas nestes diagramas podem ser obtidas apenas pelo equilíbrio de um sal em soluções aquosas de H_3PO_4 ou Ca(OH)_2 e não em soluções que contenham

outros componentes além do sistema ternário, por exemplo HCl ou NaOH (Carrodéguas, 2000).

2.4 Cimentos Ósseos

Cimentos odontológicos de fosfato de zinco e silicato foram desenvolvidos em 1870 e tem sido utilizado até hoje. Em 1879, Fletcher desenvolveu um cimento de silicato que apresenta excelentes propriedades, tais como cor, translucidez e ainda valor profilático, apresentando ação anticariogênica derivada dos fluoretos presentes em sua composição. Geralmente, cimentos odontológicos devem ser não tóxicos e devem apresentar uma forte ligação aos dentes assim como possuir propriedades mecânicas e químicas (Williams et al., 1994). Entretanto, eles têm apresentado muitas desvantagens, especialmente a solubilidade e desintegração sofrida no meio bucal, além do aspecto relacionado à toxicidade e baixa resistência mecânica.

Outro tipo de cimento muito utilizado pelos dentistas é o de ionômeros de vidro. Ele é constituído de um vidro de aluminossilicato com elevado teor de fluoreto, que interage com ácido polialquênico (Andersson & Dahl, 1994; Mount, 1996). O alumínio, que é o responsável pelo seu endurecimento, também retarda a formação e crescimento de cristais de hidroxiapatita, além de perturbar a mineralização do osso. Os cimentos de ionômeros de vidros são classificados como: cimentos para cimentação, restauração e forramento ou base.

Dentre os mais estudados, destaca-se o polimetilmetacrilato (PMMA) constituído por um polímero acrílico utilizado na fixação de próteses. Esse tipo de cimento foi introduzido no início de 1960 por Charnley. O cimento ósseo é colocado nos espaços vazios entre o implante e a superfície óssea endosteal, endurecendo em pouco tempo e assegurando a firme colocação da prótese ao preencher por completo o espaço vazio entre o implante e o osso (Pascual et al., 1996).

Existem três vantagens na aplicação de cimentos ósseos:

- As dimensões da cavidade formada no osso para poder fixar a prótese não são tão críticas, pois o cimento proporciona um encaixe ajustável;
- Como não é um ajuste exato, não é necessário golpear a prótese ao colocá-la na posição correta, evitando-se, com isso, possíveis fraturas;
- Os cimentos aumentam a capacidade de resistência a cargas da prótese ao distribuir uniformemente as tensões entre a prótese e o osso.

Tendo em vista o acima exposto, principalmente em razão das desvantagens observadas, procurou-se (internacionalmente) o desenvolvimento de um material semelhante ao cimento, preparado à base de fosfato de cálcio, que reuniria as vantagens da biocompatibilidade dos biomateriais à base de fosfato de cálcio e dos materiais do tipo do cimento. Estes são significativamente diferentes das cerâmicas de HA. São produzidos por cristalização direta “in vivo” e não requerem nenhum tipo de aquecimento para a formação de um implante estruturalmente estável. A parte sólida é misturada com a parte líquida, cuja composição pode ser água, sangue, solução salina ou ácido fosfórico diluído para formar uma pasta que se utiliza para reparar defeitos ósseos e que pode ser moldada intraoperativamente.

2.5 Cimento de Fosfato de Cálcio (CFC)

O termo “cimento de fosfato de cálcio” foi introduzido por Gruninger e colaboradores (Driessens et al., 1993). Segundo eles, um cimento desse tipo pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com água ou com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir à temperatura ambiente ou corporal a fim de dar lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio e dê pega por meio do intercruzamento dos cristais deste precipitado.

Os cimentos de fosfato de cálcio são constituídos por um componente ácido e outro básico, os quais, quando se misturam com água, reagem para formar um ou vários produtos com uma acidez intermediária à dos produtos de partida. Estes cimentos estão sendo objeto de intenso estudo nos últimos anos devido à sua potencial utilidade em aplicações biomédicas e também por serem materiais biocompatíveis que endurecem ou pegam no sitio de implantação (Chow, 1991; Driessens et al., 1997).

As principais vantagens dos cimentos de fosfato de cálcio são:

- Não é necessário dar forma à cavidade;
- Mínima cavidade;
- O fato de sua preparação ser realizada durante o ato cirúrgico;
- Um ótimo contato entre osso e implante;
- Biocompatibilidade e bioatividade;
- Ausência de aquecimento durante a cura.

Ainda, os cimentos de fosfato de cálcio devem possuir os requisitos necessários aos cimentos biomédicos para a aplicação clínica (Lemaitre et al., 1987):

- Ausência de toxicidade;
- Perfeita adesão ao tecido duro;
- Ausência de propriedades alogênicas ou carcinogênicas;
- Fácil manipulação;
- Dar pega e endurecer “in vivo” dentro de um tempo razoável;
- Resistência mecânica apropriada e permanente;
- Reabsoribilidade;
- Condutor e estimulador da formação de novo tecido ósseo;
- Tempos de pega e endurecimento controláveis;
- Não ocorre aquecimento durante a reação de pega (cura).

As propriedades de um cimento de fosfato de cálcio, tais como plasticidade inicial, tempo de endurecimento e resistência final podem ser controladas por meio de fatores inerentes aos componentes do pó e do líquido, à mistura de ambos e às condições de maturação da pasta, como podemos observar na Tabela 03 (Carrodéguas, 2000).

Tabela 03. Fatores que afetam as propriedades das pastas de cimento (Carrodéguas, 2000).

Pó	Natureza e pureza dos constituintes sólidos Proporção de mistura dos constituintes sólidos Aditivos (aceleradores, retardadores) Tamanho de partículas
Líquido	Aditivos (aceleradores, retardadores) pH
Mistura	Relação líquido/sólido (L/P)
Maturação	Temperaturas Umidade pH do meio

O primeiro cimento de fosfato de cálcio desenvolvido se deve a Brown & Chow (1985). Eles encontraram que misturas de pós de fosfato tetracálcico (TTCP) e fosfato dicálcico di-hidratado (DCPD) davam pega ao serem misturados com água, devido à dissolução dos fosfatos de cálcio constituintes e à precipitação de finos cristais de hidroxiapatita, cujo entrelaçamento proporciona a resistência mecânica do material resultante. Dessa forma, Ishikawa et al., (1994, 1995), Tenhuisen et al., (1996), Fukase et al., (1990), Hong et al., (1991), Constantino et al. (1991), Friedman et al., (1991), Shindo et al. (1993), Takechi et al., (1996), deram continuidade a este estudo e a outros sistemas de CFC.

Lemaitre et al., (1987, 1992), Mirtchi et al., (1989, 1990, 1991), Muting et al. (1993), e Bohner et al. (1996) estudaram combinações de β -fosfato tricálcico (β -TCP) com pós ou soluções aquosas de fosfato monocálcico (MCPM),

carbonato de cálcio (CC) e ácido ortofosfórico. Neste sistema, a fase resultante da reação de pega é o DCPD, que pode posteriormente hidrolizar-se à hidroxiapatita por meio da ação dos fluidos corporais.

Por outro lado, Bermudez et al., (1993), Driessens et al., (1993, 1994, 1995), e Fernández et al., (1995), depois de estudar o tempo de pega de 108 possíveis formulações cimentos de fosfato de cálcio em que só 26 possuíam resistência à compressão superior a 1 MPa, concentraram seus trabalhos no sistema baseado em α -fosfato tricálcico (α -TCP) como constituinte reativo. Neste sistema, a fase resultante de pega é uma hidroxiapatita deficiente em cálcio similar à hidroxiapatita biológica (Driessens et al., (1997), Ginebra et al., (1995-A), Bermudez et al., (1994), Ginebra et al. (1995-B), Ginebra et al., (1995-C) e Jansen et al., (1995)).

A reação de pega dos cimentos de fosfato de cálcio é fixada pelos componentes do cimento em pó. Quando os constituintes do cimento (sais de fosfato de cálcio) são misturados com o líquido para a reação, eles começam a dissolver na solução, e esta solubilização ocorre até que a composição do líquido encontre um ponto invariante, que é a interseção das isotermas de solubilidade dos componentes no líquido utilizado, ou o ponto de saturação da solução no caso de um único sal de fosfato de cálcio. Quando esse ponto é encontrado, solubilizações adicionais dos sais de fosfato de cálcio só poderão ocorrer se ocorrer a precipitação de algum fosfato de cálcio, com o qual a solução aquosa está supersaturada, removendo íons cálcio e fosfato da solução. O pH do ponto quase invariante determinará o tipo de precipitado, exceto quando se tratar de formas amorfas (ACP I e ACP II), como mostrado na Tabela 04.

Tabela 04. Fosfatos de cálcio possíveis de serem precipitados em temperatura ambiente ou corpórea (Driessens et al., 1997).

Ca/P	Abrev.	Nome	Fórmula	pH
1,35	ACPI	Fosfato de cálcio amorfo I	-	4-9
1,34	ACPII	Fosfato de cálcio amorfo II	-	4-9
0,5	MCPM	Dihidrogenofosfato de cálcio monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0-2
1	DCPD	Hidrogenofosfato de cálcio di-hidratado (Brushita)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2-6
1,33	OCP	Fosfato octacálcio	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,5-7,0
1,5	CDHA	Hidroxiapatita deficiente em cálcio	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	6,5-8,5
1,67	HA	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9,5-12

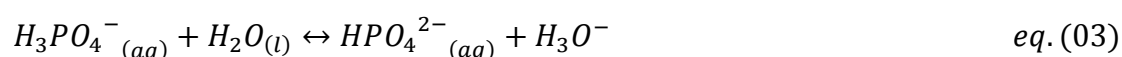
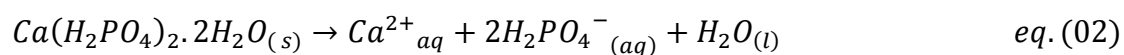
Os principais compostos utilizados nas composições dos cimentos aparecem na Tabela 05, junto com as siglas utilizadas para identificá-los em ordem decrescente de caráter ácido.

Tabela 05. Compostos utilizados em composições de cimento (Lemaitre et al., 1987).

Abreviatura	Nome	Fórmula
MCPM	Di-hidrogenofosfato de cálcio monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
DCPD	Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado (Brushita)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
DCP	Hidrogenofosfato de cálcio (Monetita)	CaHPO_4
OCP	Fosfato octacálcio	$\text{Ca}_8(\text{H}_2\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
TCP (α , β)	Fosfato tricálcio	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
HA	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$
TTCP	Fosfato tetracálcio	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
CC	Carbonato de cálcio	CaCO_3
CSH	Sulfato de cálcio hemihidratado	$\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$

2.5.1 Cimento de DCPD (Brushita)

Lemaitre e Mirtchi (1987) estudaram a formação do cimento DCPD, que está entre os mais solúveis em condições fisiológicas e mais reabsorvível *in vivo* (Boher, 2000), a partir da mistura do β -fosfato tricálcio (β -TCP) com o fosfato monocálcio monohidratado (MCPM). Segundo estes autores, o tempo de pega inicial deste cimento está associado à dissolução do MCPM seguida de uma progressiva cristalização de DCPD. Estas transformações podem ser representadas pelas seguintes reações químicas:



A primeira reação representa a dissolução do MCPM, a segunda a liberação de íons H^+ como resultado do equilíbrio de dihidrogenofosfato na solução, a terceira corresponde a precipitação do DCPD devido à dissolução do MCPM e a última representa a reação de formação do DCPD devida à reação do β -TCP com os íons liberados da dissolução do MCPM.

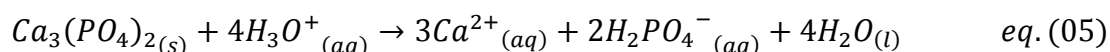
Mirtchi e colaboradores (1989), citado por Carrodéguas (2000), verificaram que a adição de pirofosfato de cálcio (CPP), sulfato de cálcio dihidratado (CSD), e sulfato de cálcio hemihidratado (CSH) como aditivo aumenta o tempo de pega de 30 segundos para 10 minutos e que o CSH aumenta a resistência à compressão diametral de 1 MPa para 3 MPa.

Os íons de pirofosfato se adsorvem no núcleo do sal cálcio e impedem a incorporação de mais íons ao redor do cristal prevenindo o crescimento cristalino e a agregação dos cristais (Terkeltaub, 2001).

A inibição do crescimento dos cristais da brushita resulta em cristais de menor tamanho e melhor empacotamento, aumentando com isso sua resistência mecânica (Grover, et al., 2005). O tempo de pega dos cimentos depende da solubilidade do componente alcalino: quanto maior a solubilidade, menor o tempo de pega (Bohner, 1993).

Os cimentos de brushita são mais frágeis que os cimentos de apatita. Geralmente a resistência à compressão é menor que 15 MPa (Lemaitre, 1995). Os cimentos de apatita possuem resistência a compressão diametral de 16 MPa e de compressão axial de 83 MPa (Driessens, 1999). A implantação *in vivo* do cimento brushita, ao contrário dos cimentos de apatita, diminui suas propriedades mecânicas devido a sua alta solubilidade (Ikenaga et al., 1998).

Bohner e colaboradores (1993) propuseram para o sistema β -TCP – H_3PO_4 – H_2O um mecanismo de reação similar ao do cimento β -TCP – MCPM – H_2O . O processo inicia com a dissolução do β -fosfato tricálcio:



seguido da precipitação do DCPD:



Para este cimento, o tempo de pega ficou entre 80 e 160 segundos, e a resistência a compressão diametral foi de 0,1 a 2 MPa (Bohner, et. al., 1993). O tempo de pega e a resistência aumentam com a presença de íons SO_4^{2-} , $P_2O_7^{4-}$, e $(C_6H_5O_7)^{3-}$ (Bohner et al., 1996).

Formulações baseadas na reação β -TCP/ H_3PO_4 possuem vantagens em relação a formulações baseadas em β -TCP/MCPM, tais como, preparação mais fácil e rápida, melhor controle da composição química e reatividade, propriedades físico-químicas melhores, como maior tempo de endurecimento e maior resistência mecânica devido à melhor homogeneidade. A formulação β -TCP/MCPM é composta apenas por pós, dificultando a homogeneização dos reagentes (Bohner et al., 1997a).

2.6 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um material vivo que tem a função de formar o esqueleto e conseqüentemente proporcionar locomoção e proteção ao organismo. Ele é sujeito a carregamentos permanentes e transientes causados por atividades diárias e eventualmente a carregamentos extremos como conseqüência de acidentes. Ao contrário dos materiais inertes, esses tecidos são capazes de responder e se adaptar ao seu ambiente. O crescimento ósseo e a cura de uma fratura são processos de caráter temporário, já a estrutura interna dos ossos é mantida e adaptada por um processo denominado remodelação óssea (Rüberg, 2003).

Esse processo é responsável pela remoção do micro-dano e conseqüentemente pelo aumento da vida útil de um tecido ósseo. Além disso, a adaptação estrutural a mudanças no ambiente mecânico desempenha um papel importante no contexto de implantes e próteses.

O tecido ósseo é formado de células e matriz óssea (material intercelular calcificado). As células ósseas constituem uma pequena fração do tecido ósseo; contudo, são responsáveis por um processo contínuo de remodelação, isto é, de formação e reabsorção óssea. São três tipos: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos (Junqueira et al., 1990).

A matriz óssea é secretada por osteoblastos que se encontram na superfície da matriz existente e que sintetizam nova matriz óssea gerando a formação primária do tecido. Alguns osteoblastos permanecem livres na superfície, enquanto outros se tornam gradativamente embebidos em sua própria secreção. Este tecido recém produzido é chamado osteóide. Ele é rapidamente convertido em matriz óssea mineralizada pela deposição de cristais de fosfato de cálcio. Uma vez aprisionado na matriz mineralizada, a célula denominada de osteócito, não tem oportunidade de se dividir, embora continue a secretar mais matriz, em pequenas quantidades, em torno si mesma. O osteócito ocupa uma pequena cavidade, ou lacuna, na matriz, mas não está isolado na matriz óssea. Canais muito pequenos, ou canaliculos, irradiam de cada lacuna e contêm processos celulares do osteócito que está nesta lacuna, permitindo-lhe formar junções comunicantes com osteócitos vizinhos. Embora a própria rede de osteócitos não realize a secreção e a reabsorção de quantidades substanciais de matriz, eles são responsáveis por parte do controle das atividades das células que o fazem.

Enquanto a matriz óssea é depositada pelos osteoblastos, ela sofre reabsorção pelos osteoclastos que são células multinucleadas responsáveis pela erosão e reabsorção do osso previamente formado. Sua estrutura é resultante de fusões de células mononucleadas originadas da medula óssea e que exibem grande semelhança com os tipos celulares derivados do sistema mononuclear fagocitário, incluindo a acentuada presença de lisossomos. Funcionalmente, os osteoclastos exibem uma ativa secreção de enzimas lisossomiais sobre a matriz óssea, produzindo, principalmente, a lise de fibras colágenas e a liberação de íons cálcio fixados na matriz (Aires, 1991). A Figura 06 mostra esquematicamente as células ósseas.

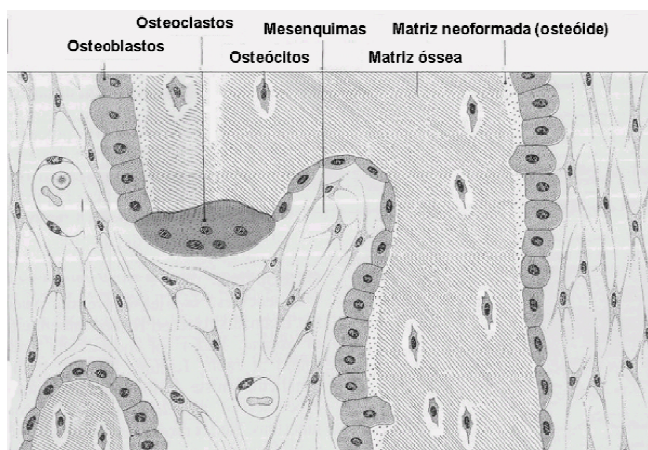


Figura 06. Diagrama das células ósseas (Junqueira, 1999).

O osso é um tecido com matriz protéica colágena impregnada com sais minerais, especialmente fosfatos de cálcio. A proteína nas fibras colágenas, que forma a matriz óssea, é complexa. Quantidades disponíveis de proteínas e minerais adequadas para a manutenção da estrutura óssea normal devem estar disponíveis. Os minerais nos ossos, na maior parte, encontram-se na forma de sais complexos que se assemelham e podem mesmo ser idênticos à hidroxiapatita estequiométrica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$. Existem também, no osso, sódio e pequenas quantidades de magnésio e carbonato o que justifica a existência de apatitas não estequiométricas e com substituições de vários grupos iônicos.

Os ossos são dotados de uma habilidade notável para adaptar sua estrutura em resposta à carga a que são submetidos. Este comportamento de adaptação sugere que a deposição e reabsorção da matriz são controladas de alguma maneira pela deformação mecânica local, mas os mecanismos envolvidos não são ainda compreendidos. Um complexo mecanismo de sinalização ocorre na matriz óssea através da síntese de substâncias quando a matriz é submetida a deformação.

De um ponto de vista microscópico, existem dois tipos de tecido ósseo: trabecular (Figura 07) e cortical (Figura 08), facilmente distinguidos pelo seu grau de porosidade. Os tecidos ósseos dos dois tipos são envoltos pela medula, que é a fonte de células ósseas e contém vasos sanguíneos e nervos.

O osso cortical (ou compacto) tem uma porosidade muito baixa: entre 0,05 e 0,10. Esse osso, que forma aproximadamente 80% de um esqueleto maduro, pode ser encontrado tanto na cobertura (córte) em torno do osso trabecular ou como a diáfise dos ossos longos. No osso cortical também existem cavidades de reabsorção, que são espaços temporários de remodelação de diâmetro próximo a 200 μm . Os ósteons são células ósseas que estão dispostas em paralelo ao longo eixo do osso cortical. A Figura 08 mostra a microestrutura do osso cortical.

O osso trabecular (também chamado de osso esponjoso) que forma 20% de um esqueleto maduro, é uma estrutura muito porosa achada em ossos curtos e chatos assim como no final de ossos longos. Sua alta porosidade varia entre 0.75 e 0.95. Os poros são interconectados e preenchidos pela medula. A matriz mineralizada é composta por uma estrutura em placas formando as trabéculas que têm espessura de aproximadamente 200 μm (Rüberg, 2003). Apesar de ter menor massa, o osso trabecular tem superfície total cinco vezes maior que o osso cortical, o que o torna desproporcionalmente importante na dinâmica do cálcio (Le Geros, 1991).

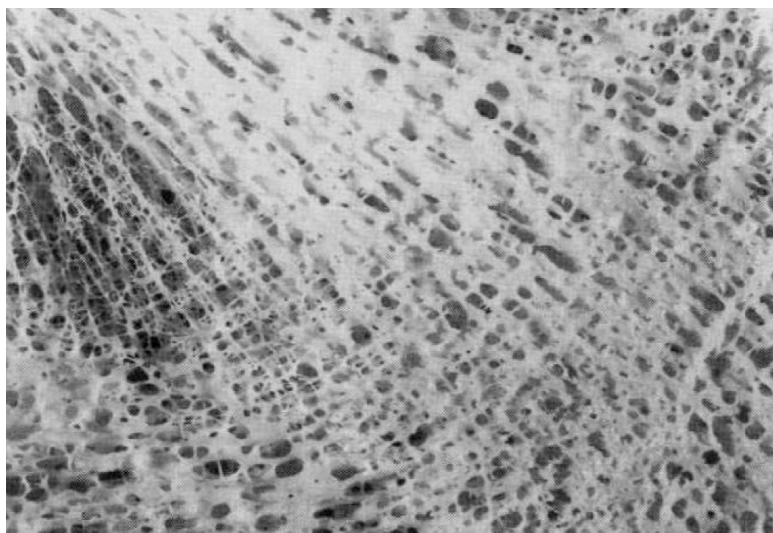


Figura 07. Osso trabecular (Martin et al., 1998).

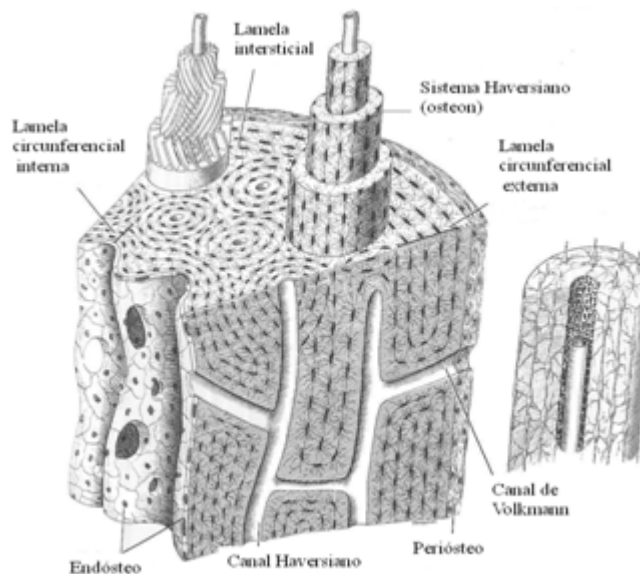


Figura 08. Vista esquemática do osso cortical (Junqueira et al., 1990).

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de melhorar o comportamento mecânico, elevar a tenacidade à fratura e ampliar a utilização de biocerâmicas em diferentes áreas biomédicas que exigem solicitação mecânica. As características de propriedades mecânicas de um biomaterial sinterizado estão relacionadas principalmente à síntese do material e à densificação obtida durante a sinterização. Portanto, os maiores valores de resistência mecânica estão associados à obtenção de materiais sinterizados com densidade próxima da densidade teórica.

A Tabela 06 mostra um comparativo do comportamento do osso (trabecular e cortical), com as diversas biocerâmicas em relação a algumas propriedades mecânicas.

Tabela 06. Propriedades mecânicas de biocerâmicas e osso humano (Kokubo et al., 2003).

Propriedades Mecânicas	Compressão (MPa)	Tração (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Tenacidade (MPa x m ^{1/2})
Bioglass 45S5 [®]	-	42	35	-
Hidroxiapatita	500-1000	115-200	80-110	1,0
Vitro Cerâmicas	1080	220	118	2,0
Alumina	-	4500	400	5-6
Zircônia Parcialmente Estabilizada	-	2000	150	15
β-TCP	140-154	460-687	33-90	-
Osso Humano (trabecular)	2-12	-	0,05-0,5	-
Osso Humano (cortical)	100-230	50-150	7-30	2-12

2.7 Regeneração Óssea

A regeneração óssea é um dos processos de reparo mais importantes do corpo porque o osso, assim como o fígado, tem a característica de sofrer regeneração quando lesionado, dependendo da extensão da lesão. O osso, sendo resistente e rígido, representa o principal elemento de sustentação do corpo. O tecido altamente mineralizado que o constitui, o tecido ósseo, exibe, além das suas propriedades mecânicas, uma alta capacidade de regeneração espontânea. Assim, fraturas ou defeitos ósseos são curados com a produção de novo tecido ósseo com a mesma alta organização estrutural do tecido original. No entanto, esta capacidade regenerativa é limitada pelo tamanho da lesão. Assim defeitos ósseos extensos, provocados por traumas, infecções, neoplasias e anomalias de desenvolvimento não se regeneram

espontaneamente, representando um problema atual na medicina e odontologia (Junqueira, et al., 1995). O preenchimento de defeitos ósseos com osso autógeno (do mesmo indivíduo) é uma opção de tratamento regenerativo. Entretanto, o osso autógeno tem uma disponibilidade limitada para enxertos (Herculian, et al., 2000). Outra desvantagem para essa alternativa é a necessidade de duas incisões: uma para retirar material e outra para preencher o defeito ósseo. Substitutos apropriados e biocompatíveis para enxertos são, portanto requeridos. Outra opção é a utilização de osso alógeno (de outro indivíduo), o que geralmente não é desejável por constituir um possível vetor de doenças. Alguns biomateriais podem ser usados com sucesso para o preenchimento de cavidades óssea para reposição de osso perdido após a remoção de um tumor ou trauma. Essa última opção, utilização de biomateriais sintéticos, não apresenta os inconvenientes das duas opções anteriores.

2.8 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Sistemas de liberação controlada representam um desenvolvimento relativamente recente, com o objetivo de prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos (Farrel, et al., 2002).

Desta forma, o desenvolvimento de formas diferenciadas de transporte do medicamento no organismo é essencial para que os efeitos desejados sejam atingidos em sua plenitude, reduzindo o risco de intoxicações e dinamizando o tratamento.

Um dispositivo de liberação controlada de fármacos consiste da combinação de um material com um agente ativo terapêutico específico, sem destruir a integridade da substância ativa, permitindo que ela seja liberada adequadamente no interior do organismo ou sítio de tratamento.

Os sistemas de liberação, freqüentemente descritos como “drug delivery systems”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (Azevedo, 2002).

- Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz;
- Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- Natureza e composição dos veículos variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);
- Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

Nas formas de administração convencionais (spray, injeção, pílulas) a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Considerando que cada droga possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (Farrel, 2003). A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser mais bem visualizada na Figura 09.

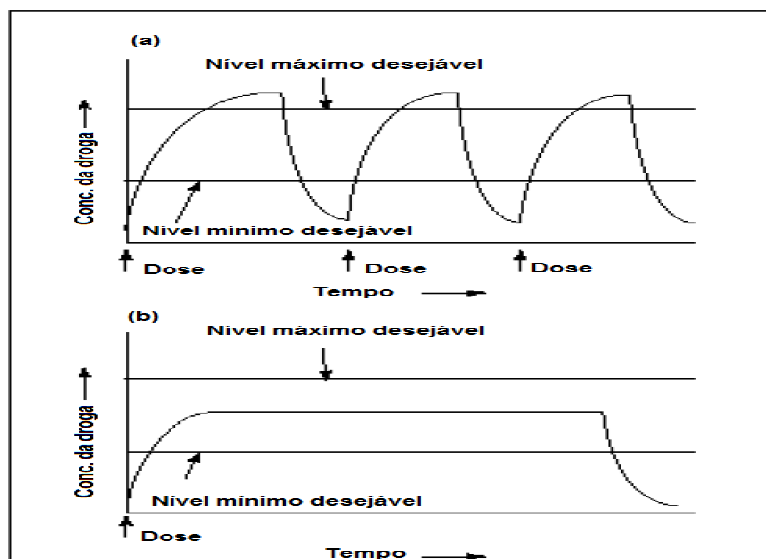


Figura 09. Concentração de uma droga modelo no sangue com (a) dosagem tradicional da droga e (b) dosagem com liberação controlada (Ansel, et al., 1999).

Historicamente, as primeiras tentativas de se modificar a liberação de um fármaco foram realizadas quando se revestiam pílulas para mascarar o sabor desagradável dos fármacos. Entre 1940 e 1950, surgiram os primeiros sistemas de liberação modificada, representados por formas farmacêuticas que permitiam a liberação de parte do fármaco no estômago e parte no intestino (ou que evitavam a liberação gástrica). Tais medicamentos eram sensíveis às variáveis fisiológicas. Em 1952, surgiu uma das primeiras formas farmacêuticas de ação prolongada, o Spansule, da empresa Smithkline Beecham (Ratner, 1996). O medicamento consistia de uma cápsula gelatinosa dura, contendo grânulos esféricos de colorações diferentes, correspondendo a revestimentos diferentes. Usando revestimentos de espessuras diferentes, tempos de dissolução poderiam variar, prolongando a ação do agente terapêutico. Estes revestimentos permitiram a liberação inicial da dose terapêutica necessária, seguida da liberação de doses menores, por um período de 10-12 horas. Entretanto, a funcionalidade de tais produtos depende do ambiente externo que varia muito de paciente para paciente. Por esta razão, a partir da década de sessenta (60), muitos esforços foram realizados com o objetivo de desenvolver

produtos capazes de liberar drogas por cinéticas reprodutíveis e previsíveis. Idealmente, tais produtos não são significativamente afetados pelo ambiente externo, de modo que a variabilidade de paciente para paciente é reduzida (De Sousa, 2006).

Ao longo das últimas décadas, o campo de liberação controlada de drogas experimentou um acelerado desenvolvimento, com diversas organizações (como a CRS, Controlled Release Society) e jornais científicos (como o *Advanced Drug Release*) especificamente dedicados a este tema. Além disto, alguns textos cobrindo este tópico são encontrados na literatura (Chien, 1992; Renade, et al., 2003; Ansel, et al., 1999). Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas e aplicadas para se promover uma liberação controlada do fármaco, com o objetivo de regular a sua velocidade de liberação, manter seu nível terapêutico constante por um maior período de tempo (processo conhecido como liberação de ordem zero), além de direcionar sua ação a um tecido específico.

Por definição, o termo “sistema de liberação de fármacos” refere-se à tecnologia utilizada para otimizar a liberação de um fármaco, onde o princípio ativo deve ser liberado e/ou absorvido, melhorando a resposta terapêutica (Ansel et al., 1999). Os tratamentos convencionais utilizados para combater processos infecciosos (soluções, suspensões, pílulas, entre outros) requerem uma administração por um longo período de tempo, visando manter os níveis terapêuticos do fármaco no organismo. Muitas vezes, tais níveis não são alcançados, pois o tratamento não exhibe resultados ou apresenta efeitos colaterais devido à alta concentração do fármaco.

Prova disso é que, de acordo com Oliveira et al., (2004), raramente a experiência clínica com agentes terapêuticos satisfaz as expectativas criadas em torno de resultados pré-clínicos com medicamentos, desde que entre o local de administração e o órgão ou tecido alvo existe uma série de barreiras anatômicas, químicas ou biológicas que contrariam a obtenção do efeito terapêutico desejado.

A manutenção da concentração do medicamento na corrente sangüínea,

dentro da faixa terapêutica do medicamento, leva à redução no número de doses requeridas e ao aumento na eficácia do tratamento, pois desta forma diminui a possibilidade de alcançar níveis tóxicos ou subterapêuticos (faixa ineficaz).

Assim sendo, a busca por formas diferenciadas e mais efetivas de liberação, de forma que a droga possa atingir seu local de ação na proporção e tempo esperados, é um foco de expectativas de desenvolvimento de novos tratamentos medicamentosos e aprimoramento das formulações já existentes.

2.8.1. Principais Mecanismos de Controle da Liberação de Fármacos

Existem vários mecanismos pelos quais a liberação de um fármaco pode ser controlada em um medicamento. A classificação do sistema de liberação controlada de fármacos segundo o mecanismo de liberação é feita tomando-se por base o mecanismo principal. O tipo de mecanismo que controla a liberação do fármaco determina também a sua classificação, podendo ser: sistemas de difusão controlada, sistemas controlados quimicamente, sistemas controlados por expansão e contração, sistemas osmoticamente controlados, etc. (Ratner, 1996; Simó et al., 2003).

➤ Difusão

A difusão molecular através de polímeros e materiais cerâmicos é um meio eficiente, simples e seguro de alcançar a liberação controlada de uma variedade de agentes ativos. Diz-se que um medicamento ou dispositivo age por difusão quando este fenômeno ocorre em alguma fase da liberação e representa um passo decisivo na liberação total do fármaco. Os principais dispositivos que utilizam este fenômeno como controladores da liberação do fármaco são do tipo reservatório ou matricial.

➤ **Erosão**

O material que é utilizado em dispositivos controlados por difusão desempenha um papel relativamente passivo, tendo função de carrear e retardar a velocidade com a qual o fármaco é distribuído para o alvo. Alguns dispositivos são elaborados para desempenhar um papel um pouco mais ativo no processo de liberação. Tais materiais se desgastam quando sofrem reações químicas, libertando o fármaco para a distribuição no alvo. Estes sistemas são classificados em duas categorias:

- Sistemas de imobilização física: também chamados erodíveis ou biodegradáveis, nos quais o fármaco, fisicamente imobilizado pela rede do material, é liberado após a erosão desta;
- Sistemas de imobilização química: nos quais o fármaco está quimicamente ligado ao esqueleto polimérico (cadeia pendente) ou ele próprio é parte do esqueleto polimérico. A liberação de fármaco destes sistemas é principalmente governada pela cinética de degradação da ligação, sendo, portanto, específica para cada sistema.

➤ **Expansão**

São sistemas monolíticos, onde o fármaco se encontra dissolvido ou disperso em um suporte polimérico hidrofílico, com ou sem ligações cruzadas, o qual se expande sem se dissolver quando em contato com o meio aquoso. Estes sistemas são denominados hidrogéis. O grau de expansão (e, portanto, a quantidade de fármaco liberada) depende do balanço hidrofílico/hidrofóbico da matriz polimérica e do grau das ligações cruzadas. A migração do fármaco para o meio aquoso de um sistema como este implica um processo de absorção de água e desorção do fármaco.

➤ **Osmose**

As bombas osmóticas são semelhantes aos dispositivos reservatórios, mas contém um agente osmótico (por exemplo, o próprio fármaco na forma de sal), o qual retira água do meio circundante através de uma membrana semipermeável. Uma pressão é gerada ao longo do dispositivo, o que força a saída do fármaco (em solução) do dispositivo, através de um orifício. Já que o volume do dispositivo permanece constante e há um excesso de sólido (solução saturada) dentro do dispositivo, a taxa de liberação permanece constante, liberando um volume de solução do fármaco igual ao volume de solvente absorvido.

2.8.2. Liberação Controlada de Agentes Ativos

Entre os requisitos que devem apresentar os sistemas para sua utilização como matrizes nas formulações para liberação controlada de agentes ativos estão as suas propriedades de transporte.

O transporte de drogas através de matrizes não porosas em sistemas de liberação controlada ocorre por um processo de solução-difusão. A carga deve primeiro dissolver-se na matriz e então difundir-se da área de alta concentração da carga para a área de menor concentração. Este fenômeno pode ser quantificado pela Primeira Lei de Fick (Smith e Herbig, 1992):

$$J = -D \frac{dC_m}{dx} \quad \text{eq. (07)}$$

onde:

- J é o fluxo em $\text{g/cm}^2.\text{sec}$, C_m é a concentração do agente na membrana em g/cm^3 ;
- dC_m/dx é o gradiente de concentração;
- D é o coeficiente de difusão do agente na membrana em cm^2/sec .

A liberação da carga ativa pelos sistemas de liberação controlada pode seguir uma grande variedade de comportamentos. Contudo, a cinética da liberação da maioria dos sistemas que dependem da difusão em uma matriz não porosa pode ser agrupada em três tipos de perfis de liberação:

- Cinético de ordem zero;
- Cinético $t^{1/2}$;
- Cinético de primeira ordem.

Em sistemas que exibem cinética de ordem zero a taxa de liberação permanece constante até que quase toda a carga tenha sido liberada (o termo ordem zero deriva da cinética de liberação ser independente da quantidade de droga remanescente). A taxa de liberação diminui proporcionalmente à raiz quadrada do tempo em sistemas de liberação controlada com cinética $t^{1/2}$. A cinética de liberação de primeira ordem ocorre em sistemas onde a taxa de liberação é proporcional à quantidade de droga remanescente no sistema. A liberação de primeira ordem é comum em sistemas convencionais de liberação não controlada assim como em sistemas de liberação controlada, e é caracterizada por uma diminuição exponencial da taxa de liberação com o tempo. Na Figura 10, é apresentado um perfil de liberação teórico para cada tipo de sistema.

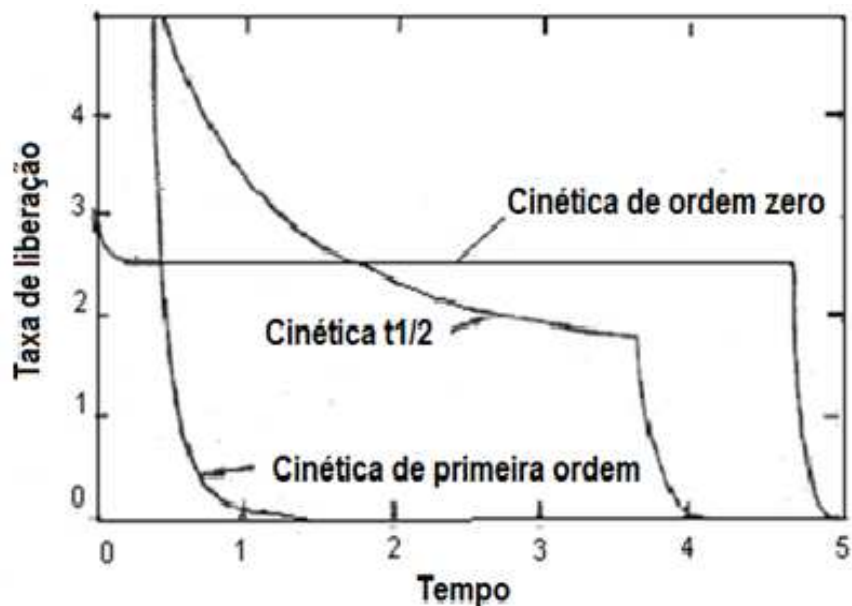


Figura 10. Comparação entre os modelos de cinética de liberação convencionais.

A maioria dos sistemas de liberação controlada pode ser incluída nos seguintes grupos (Brunstedt e Anderson, 1992):

- Sistemas reservatórios;
- Sistemas de matriz.

2.8.2.1. Sistemas Reservatórios

No sistema reservatório, é possível identificar um núcleo diferenciado (Figura 11), que pode ser uma droga sólida, uma solução diluída, ou altamente concentrada em um reservatório. Se a carga ativa é mantida em um estado saturado, o seu transporte molecular através da membrana permanecerá constante, pois a força motriz não é alterada.

Neste sistema, o fármaco encontra-se envolvido por um filme ou uma membrana de um material controlador da taxa de liberação. A única estrutura

que efetivamente limita a liberação da droga é a camada de material que envolve o reservatório. Mudanças na natureza e espessura dessa camada promovem alterações na velocidade de liberação das drogas. A membrana que envolve o reservatório permite a difusão da droga contida dentro do núcleo para o meio externo. Neste tipo de sistema, a taxa de liberação é constante se houver uma concentração constante do fármaco no interior do reservatório. Para que esta taxa de liberação constante (ordem zero) ocorra, a carga ativa deve permanecer no estado sólido ou em suspensão. Se a droga apresentar elevada solubilidade em água, será difícil manter o estado saturado e até mesmo se todos os requerimentos para uma taxa de liberação de ordem zero forem mantidos, a liberação geralmente não se manterá constante nas etapas iniciais e finais.

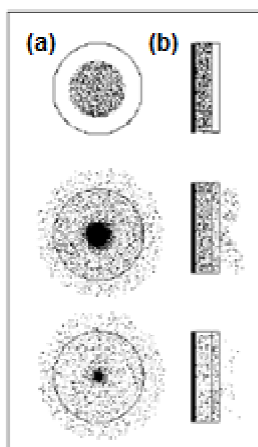


Figura 11. Liberação controlada de drogas a partir de um dispositivo de reservatório típico: (a) sistema implantável ou oral, e (b) sistema transdérmico (Ratner, 1996).

Quando o sistema de liberação controlada é colocado em um meio de liberação, é necessário certo tempo para que uma taxa de liberação constante seja alcançada, podendo ocorrer um tempo de retardo ("lag") ou uma liberação muito pronunciada inicialmente ("burst"). Se a membrana está carregada com uma pequena quantidade da carga ativa, será necessário um período de indução para que a sua liberação ocorra. Por outro lado, se as moléculas de

carga ativa se acumularam na membrana como resultado da fabricação ou estocagem, a taxa de liberação inicial será mais elevada do que a do período constante (Leong e Langer, 1987).

As equações que descrevem a cinética de liberação dos denominados sistemas reservatórios podem ser derivadas da Primeira Lei de Fick, adicionando-se fatores que descrevam a geometria do sistema. As equações 08 -10 descrevem a taxa de liberação para sistemas reservatórios de geometrias diferentes (Smith e Herbig; 1992):

➤ Cilindros:

$$\frac{dM_t}{dt} = 2\pi LDK \frac{\Delta c}{\ln(r_o/r_i)} \quad eq. (08)$$

➤ Esferas:

$$\frac{dM_t}{dt} = 4\pi DK\Delta c \frac{r_o r_i}{r_o - r_i} \quad eq. (09)$$

➤ Lâminas:

$$\frac{dM_t}{dt} = ADK \frac{\Delta c}{l} \quad eq. (10)$$

onde:

- M_t - massa da carga ativa liberada em um tempo t ;
- dM_t/dt - taxa de liberação em um tempo t ;
- L - comprimento do cilindro;

- r_o - raio externo do cilindro ou esfera;
- r_i - raio interno do cilindro ou esfera;
- l - espessura da lamina;
- A - área superficial;
- K - razão entre a concentração da carga ativa na matriz e no meio de liberação;
- Δc - diferença de concentração da carga ativa entre os dois lados da membrana.

O tempo "lag" e o efeito "burst" dependem da distribuição e difusividade da carga ativa na membrana e da espessura da membrana. As equações abaixo (11 e 12) descrevem a porção da curva de liberação referente a estes fenômenos, para um sistema de lâmina.

- Tempo lag:

$$M_t = \frac{Dc_m}{l} \left(t - \frac{l^2}{6D} \right) \quad eq. (11)$$

- Efeito burst:

$$M_t = \frac{Dc_m}{l} \left(t - \frac{l^2}{3D} \right) \quad eq. (12)$$

onde:

- M_t - quantidade de carga ativa liberada;
- c_m - concentração da carga ativa na membrana na superfície do sistema.

No final do período de liberação a concentração da carga ativa no núcleo terá alcançado um valor inferior ao de saturação e a taxa de liberação diminuirá. A medida que a concentração da carga ativa no núcleo diminui, o gradiente de concentração através da membrana diminui e uma cinética de liberação de primeira ordem é observada, podendo ser expressada pela Equação 13, para laminas (Baker e Lonsdale, 1974).

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{c_s ADK}{l} \exp\left(\frac{-ADK_t}{Vl}\right) \quad eq. (13)$$

onde:

- C_s - concentração de saturação da carga ativa no sistema;
- t - tempo;
- V - volume do reservatório.

Na prática, a liberação da carga ativa pode ser mais complicada devido a uma possibilidade de quebra simultânea da matriz, dissolução parcial da matriz por substâncias do meio, porções das drogas em diferentes formas e a liberação da droga situada na superfície sendo mais rápida do que a liberação da droga dentro da matriz. Estas complicações não foram consideradas na análise teórica anterior e devem ser objeto de discussão para cada sistema em particular (Higuchi, 1963).

2.8.2.2. Sistema Matricial

É o mais simples e largamente utilizado. A liberação da droga é freqüentemente proporcional ao quadrado do tempo de liberação.

No sistema matricial (Figura 12), a droga se encontra homogênea no material que forma o dispositivo ou adsorvida na superfície, e a sua liberação ocorre por difusão pelos poros da matriz, por degradação do material ou por uma combinação dos dois mecanismos. A taxa de liberação dos denominados sistemas matrizes diminui com o tempo. Isto ocorre devido ao caminho de difusão aumentar com o tempo, uma vez que a carga ativa próxima a superfície é liberada primeiro, a localizada no interior necessita difundir-se mais rapidamente para ser liberada a uma mesma taxa. A cinética de liberação destes sistemas não sofre alterações significativas devido a defeitos na matriz, ao contrário dos sistemas reservatórios, onde defeitos na membrana podem alterar drasticamente a cinética de liberação.

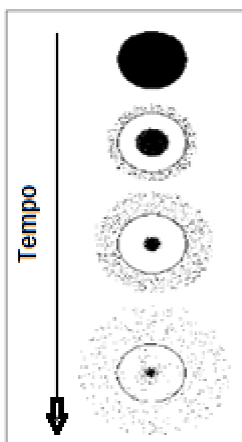


Figura 12. Liberação de droga a partir de um sistema típico de matriz para liberação controlada (Ratner, 1996).

As matrizes podem ser de três tipos de matriz:

- Matrizes onde toda a carga ativa está dissolvida;

- Matriz que apresentam pequenas quantidades da carga ativa dispersa e que são liberadas por difusão;
- Matrizes nas quais grandes quantidades da carga ativa estão dispersas e são liberadas principalmente por difusão através dos poros que são formados à medida que a carga ativa é liberada.

As cargas ativas líquidas estão geralmente dissolvidas na matriz, enquanto cargas ativas sólidas estão dispersas na mesma (Smith e Herbig; 1992).

A cinética de liberação de matrizes contendo uma carga dissolvida está dentro de dois regimes. A liberação dos primeiros 60% de carga segue a cinética $t^{1/2}$, enquanto a liberação dos últimos 60% de carga segue a cinética de primeira ordem. A porção sobreposta é descrita adequadamente por ambos os regimes. As equações 14-18 descrevem a cinética de liberação para sistemas de diferentes geometrias (Smith e Herbig, 1992):

- Cilindros:

$$\frac{M_t}{M_\infty} < 0,6 \quad \frac{dM_t}{dt} = 3M_\infty \left(\frac{D}{r^2 \pi t} \right)^{1/2} - \frac{M_\infty D}{r^2} \quad eq. (14)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} < 0,4 \quad \frac{dM_t}{dt} = \frac{4DM_\infty}{r^2} \exp \left[-\frac{\pi^2 Dt}{r^2} \right] \quad eq. (15)$$

- Esferas:

$$\frac{M_t}{M_\infty} < 0,6 \quad \frac{dM_t}{dt} = 3M_\infty \left[\frac{D}{\pi r^2 t} \right]^{1/2} - \frac{3M_\infty D}{r^2} \quad eq. (15)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} < 0,4 \quad \frac{dM_t}{dt} = \frac{6DM_\infty}{r^2} \exp\left[-\frac{\pi^2 Dt}{r^2}\right] \quad eq.(16)$$

➤ Lâminas:

$$\frac{M_t}{M_\infty} < 0,6 \quad \frac{dM_t}{dt} = 2M_\infty \left[\frac{D}{\pi l^2 t}\right]^{1/2} \quad eq.(17)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} < 0,4 \quad \frac{dM_t}{dt} = \frac{8DM_\infty}{l^2} \exp\left[-\frac{\pi^2 Dt}{l^2}\right] \quad eq.(18)$$

onde:

- M_t - massa acumulativa da liberação da carga pelo tempo;
- D - coeficiente de difusão;
- M_∞ - massa total da carga impregnada na matriz;
- dM_t/dt - taxa de liberação da carga de um sistema;
- t - tempo.

Matrizes contendo a carga ativa dispersa na matriz (menos que cerca de 20%v) exibem cinética de liberação $t^{1/2}$ para quase todo o processo de liberação, assumindo-se que a maioria da carga ativa está dispersa e não dissolvida (Smith e Herbig, 1992).

As equações 19-21 que descrevem a cinética de liberação destes sistemas contendo a carga ativa dispersada na matriz são apresentadas abaixo:

➤ Cilindros:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{4DC_{ms}M_\infty}{r^2C_\infty \ln\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right)} \quad eq. (19)$$

➤ Esferas:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{3DM_\infty}{r^2C_\infty} \left[\frac{\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right)^{1/3}}{1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right)^{1/3}} \right] \quad eq. (20)$$

➤ Lâminas:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{A}{2} \left[\frac{DC_{ms}(2C_\infty - C_{ms})}{t} \right]^{1/2} \quad eq. (21)$$

onde:

- C_{ms} - concentração de saturação da carga ativa na matriz;
- C_∞ - concentração da carga ativa inicialmente carregada na matriz.

De um modo geral, a taxa inicial de liberação de sistemas de matriz com geometria cilíndrica e esférica é mais rápida do que em um sistema de geometria laminar.

2.9 Cimentos como Veículos de Liberação de Fármacos

A possibilidade de utilizar cimentos de fosfato de cálcio como veículo de liberação de fármacos representa uma alternativa para o tratamento de enfermidades, como tumores ósseo, osteoporose e osteomielite, que habitualmente requer terapias longas e dolorosas.

Os estudos de incorporação de fármacos em cimentos de fosfato de cálcio apresentam vários aspectos. Em primeiro lugar é necessário verificar se a adição do fármaco, em fase líquida ou sólida, não modifica suas propriedades físico-químicas, tanto em nível de pega e endurecimento como em seu comportamento reológico. Em segundo lugar é necessário descrever a cinética de liberação do fármaco *in vitro*. Em terceiro é necessário estudar a efetividade da matriz para atuar como veículo de dispersão do fármaco *in vivo* (Regí, et al., 2006).

Desde os anos 90 são realizados vários estudos utilizando cimentos de fosfato de cálcio comerciais e também formulações desenvolvidos a nível experimentalmente como matrizes de liberação de fármacos. Em geral, se tem dado especial atenção aos antibióticos pela sua ampla aplicação tanto no campo da prevenção de infecções ocasionadas durante a cirurgia como no tratamento de infecções ósseas. Também se tem realizado estudos com outros medicamento, tais como: antiinflamatórios, fármacos contra o câncer e hormônios (Regí, et al., 2006).

Nos últimos anos, se tem dado atenção especial a outros tipos de substâncias ou fatores capazes de estimular a regeneração óssea e favorecer a capacidade regeneradora que tem os cimentos de fosfato de cálcio. Destaca-se também, os estudos sobre a incorporação de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) ou fatores de crescimentos transformantes β (TGF- β) em diversos cimentos de fosfato de cálcio.

Bohner e colaboradores estudaram a incorporação de sulfato de getamicina em cimento de brushita (DCPD). A adição de 3 a 16% de antibiótico modificou as propriedades reológicas e mecânicas do cimento, aumentando o

tempo de pega, que era muito curto, e a resistência mecânica, devido à presença de íons sulfato no antibiótico. A liberação do fármaco foi mais rápida nas primeiras horas, seguindo a lei de Higuchi, sendo proporcional a $t^{1/2}$ até 50% de antibiótico liberado. A velocidade de liberação diminuiu com o aumento da concentração do antibiótico do cimento devido ao efeito do íon sulfato na microestrutura. A liberação total ocorreu em sete dias. Não foram verificadas diferenças significativas quanto à incorporação do fármaco na matriz, ou seja, em pó ou em solução (Bohner, et. al., 1997-b)

Gbureck e colaboradores estudaram a adsorção de vancomicina, ofloxacina e tetraciclina na superfície de cimentos de brushita e hidroxiapatita, e de monetita preparados com a técnica de impressão 3D. Em tempo de incubação de 1 hora foi verificado que a quantidade de antibiótico adsorvida é linearmente proporcional à sua concentração no líquido de incubação. A adsorção do antibiótico segue a seguinte ordem: HA > Monetita > Brushita. A uma concentração fixa do antibiótico, a quantidade adsorvida em relação ao tempo de incubação segue o modelo de Korsmeyer-Peppas (Gbureck et al., 2007). A vancomicina e a ofloxacina são liberadas rapidamente da superfície do fosfato de cálcio em 1 e 2 dias enquanto a liberação de tetraciclina do cimento de brushita é mais lenta, apenas 25 - 30% do antibiótico é liberado em 24 horas. O restante da tetraciclina está unido à matriz de maneira irreversível mediante o efeito quelante da tetraciclina. A cinética de liberação dos antibióticos é exponencial em função do tempo e segue o modelo de Weibull (Gbureck, et al., 2007).

Otsuka e colaboradores foram os primeiros a propor a incorporação de medicamentos em matrizes cristalinas e microporosas de cimentos de fosfato de cálcio (Otsuka, et. al., 1990). Os autores investigaram a liberação *in vitro* de cefalexina e norfloxacin como droga modelo em um cimento de hidroxiapatita. A liberação ocorreu em 250 horas e seguiu a equação de Higuchi.

Nachiondo e colaboradores estudaram o efeito da adição de sulfato de gentamicina em um cimento de fosfato de cálcio não especificado. A presença de 0,15% de antibiótico não alterou o tempo de pega, a força de compressão

nem a injetabilidade, mas 3,3% de antibiótico modificaram a resistência do cimento. Segundo a liberação *in vitro* do antibiótico, o sistema é adequado para a prevenção e o tratamento da osteomielite (Nachindo, et. al., 1994).

Hammanishi e colaboradores estudaram a liberação *in vitro* de vacomicina em um cimento de hidroxiapatita formado por TTCP+DCPD. A concentração do antibiótico no cimento foi de 1% e 5%, a liberação foi realizada em 2 e 9 semanas, respectivamente (Hammanishi, et. al., 1996).

Kamegai e colaboradores utilizaram um cimento de hidroxiapatita formado por TTCP+DCPD como portador de proteína morfogenética óssea (BMP). A implantação do cimento no músculo de ratos resultou na formação de tecido ósseo. Portanto esse material é osteoindutor. A utilização de cimento incorporado com BMP no sitio de uma osteotomia de 5 mm de longitude realizada em fêmur de ratos produziu a total regeneração do defeito e a reabsorção do cimento no fim de 6 semanas (Kamegai, et. al., 1994).

2.10 Antibióticos β -Lactâmicos

Antibióticos são agentes quimioterápicos naturais produzidos por um microorganismo, que em quantidade muito pequena, inibem o desenvolvimento de outros microorganismos. Os antibióticos β -lactâmicos incluem penicilinas, monobactâmicos, cefalosporinas e carbapenens. Todos contêm um núcleo básico comum, o anel β -lactâmico, que é composto de três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio. Estes antibióticos afetam a síntese dos componentes do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Sem a proteção da parede celular, a célula provavelmente morrerá por absorção de água, aumento de volume e conseqüente rompimento (Vieira, 2003).

Existem muitas penicilinas diferentes, mas todas têm uma estrutura central denominada ácido 6-amino penicilânico, apresentado na Figura 13. As diferenças entre as várias penicilinas devem-se às diferenças nas cadeias laterais (parte da molécula além daquela da estrutura central).

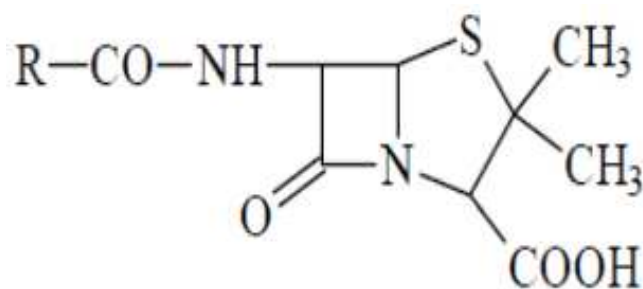


Figura 13. Ácido 6-Aminopenicilânico (6-Apa): Estrutura principal da penicilina G e comum a todas as penicilinas (Pelczar et al.,1996).

2.10.1. Ampicilina

O primeiro antibiótico β -lactâmico semi-sintético, derivado da penicilina G a partir da substituição de sua cadeia lateral, foi a ampicilina (ácido 6-[2-amino-2-fenilacetamida] penicilânico), preparada primeiramente por Doyle em 1961. A fórmula molecular da ampicilina é $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ com massa molar de 349,42. O anel β -lactâmico, que é composto de três átomos de carbono e um de nitrogênio, pode ser visto na figura 14. Após extensas avaliações farmacológicas e antimicrobianas, este antibiótico mostrou-se estável em meio ácido, bem absorvido e efetivo a baixa concentração, para uma ampla variedade de organismos Gram-negativos e Gram-positivos (Hou et al., 1969).

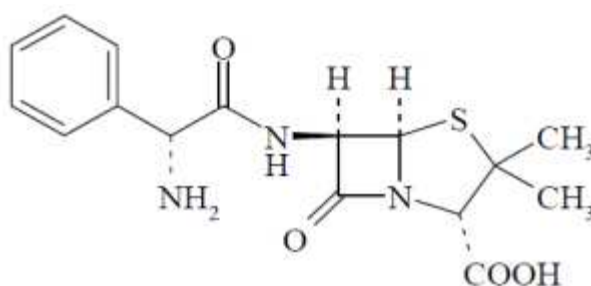


Figura 14. Estrutura da Ampicilina (Ferreira, 2004).

A ampicilina deve sua atividade e estabilidade aparentemente à presença do grupo amino livre na posição α da cadeia lateral. Normalmente a produção de ampicilina por síntese química envolve um processo complexo que requer a proteção do grupo α -amino de fenilglicina. Requer ainda o uso de derivados altamente reativos da fenilglicina (instáveis), condições anidras, temperaturas muito baixas, e o uso de compostos altamente tóxicos (piridina, dimetilanimina e diclorometano) na separação do produto, já que a síntese resulta numa mistura final complexa, (Ferreira, 2004).

2.10.1.1. Características da Ampicilina

➤ Química

Ampicilina é uma aminopenicilina, só se diferenciando estruturalmente de penicilina G pela presença de um grupo amino na posição alfa no anel benzênico. Ampicilina está disponível comercialmente na forma trihidratada para administração oral e como sal de sódio para administração intramuscular. Sua potência é expressa em termos de ampicilina calculada em base anidra. Ampicilina trihidratada ocorre como um pó branco cristalino, praticamente sem odor que é ligeiramente solúvel em água (solubilidade aquosa de cerca de 6 mg/ml a 20°C e cerca de 10 mg/ml a 40°C). Ampicilina sódica ocorre como um pó branco, cristalino, sem odor, higroscópico, muito solúvel em água.

➤ Estabilidade

Cápsulas de ampicilina para suspensão oral devem ser armazenadas entre 15°C e 30°C. A suspensão oral pronta preferencialmente deve ser refrigerada entre 2°C e 8°C por catorze dias, mas é estável por sete dias a temperatura ambiente. Injeções de solução de ampicilina sódica devem ser usadas dentro de 1 hora e não devem ser congeladas. Ampicilina sódica é

potencialmente (química e física) incompatível com algumas drogas, incluindo aminoglicosidas, mas a compatibilidade depende de vários fatores (por exemplo: concentração das drogas, espécie do diluente usado, pH resultante, temperatura) (Ferreira, 2004).

➤ **Espectro**

Com base em seu espectro de atividade, a ampicilina é classificada como uma aminopenicilina. A Ampicilina compartilha os mesmos usos que outras aminopenicilinas, principalmente para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas suscetíveis (por exemplo, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella sp.*). Esse antibiótico também é usado para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas suscetíveis (por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, estafilocócitos não produtores de penicilinas, *Clostridium sp*, *Bacillus anthracis*, *Corinebacterium xerose*, *Listeria* e grande parte dos enterococos); entretanto, como outras aminopenicilinas, a ampicilina geralmente não deve ser usada para o tratamento de infecções por estreptococos ou estafilococos, quando a penicilina natural seria efetiva. Oralmente administrada, a ampicilina não deve ser usada para tratamentos iniciais graves, infecções com risco de morte. A Ampicilina geralmente tem o mesmo espectro de atividade e o mesmo nível de atividade contra organismos suscetíveis à amoxicilina. Entretanto, é menos ativa *in vitro* que a amoxicilina contra enterocócitos e *Salmonella sp.*, porém mais ativa que amoxicilina contra *Shigella* e enterobactérias (Ferreira, 2004).

➤ **Absorção**

Ampicilinas anidras e trihidratadas geralmente são estáveis na presença de secreções gástricas ácidas e 30 a 55% da dose oral é absorvida em adultos em jejum. A presença de alimentos no estômago geralmente diminui velocidade

e extensão da absorção de ampicilina. Ampicilina é distribuída pela bÍlis. Concentrações biliares de ampicilina em pacientes com função biliar normal podem ser 1 – 30 vezes maiores que concentrações simultâneas no soro, para doses orais únicas de ampicilina.

2.11 Técnicas de Caracterização de Biomateriais

A caracterização completa de pós envolve uma série de análises para determinação precisa de propriedades do pó produzido. Várias técnicas de caracterização são utilizadas na avaliação estrutural e físico-química de pós antes e após a sinterização, as quais serão descritas a seguir:

2.11.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia e Raios X por Dispersão de Energia (MEV-EDX)

Em muitos campos das ciências dos materiais um conhecimento detalhado da natureza física das superfícies de sólidos é de grande importância. O método clássico para se obter tal informação era por microscopia ótica, que ainda é uma técnica importante para a caracterização das superfícies. A resolução da microscopia ótica é, no entanto, limitada por efeitos de difração na ordem de grandeza de comprimento de onda da luz (Skoog, et al., 2002).

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica que produz informações fundamentais para quem sintetiza ou estuda materiais sólidos e deseja obter algum conhecimento a respeito da superfície destes. Em se tratando de Ciência dos Materiais, esta técnica é apropriada para colher informações resultante das interações entre um feixe de elétrons primários (EP) incidido sobre o material de estudo e elétrons das camadas eletrônicas dos átomos da superfície do material analisado. Na intenção de aumentar a potencialidade da técnica de MEV, especialmente quando se trata da

caracterização de materiais opacos, costuma-se acoplar ao equipamento um detector para captar os raios X emitidos por átomos (EDX) da amostra. O equipamento de MEV-EDX consiste de um sistema óptico-eletrônico formado por um canhão de elétrons, um sistema de demagnificação e uma unidade de varredura. No canhão de elétrons, ocorre a formação do feixe de EP que em seguida é acelerado por uma diferença de potencial, em direção à amostra. Ao sair do canhão, o feixe de elétrons se encaminha para o sistema de lentes eletrônicas e eletromagnéticas, isso é necessário devido ao fato de o feixe oriundo do canhão ser bastante grosseiro para produzir boa imagem em grandes aumentos. O sistema de demagnificação tem a função de alinhar o feixe, controlar sua velocidade e corrigir possíveis defeitos de espalhamento, para que a profundidade alcançada no interior do material seja efetiva e tenha energia suficiente para interagir com os elétrons da amostra (neste caso a amostra também pode ser movimentada em relação a um eixo z para alcançar melhores resultados). O sistema de varredura consiste em variar a área atingida pelo feixe, sempre mantendo uma boa focalização para este, o que permite diferentes e excelentes resoluções da superfície dos materiais sob caracterização. Ao incidir sobre o material de estudo, o feixe de EP interage com os elétrons da amostra fornecendo energia para estes. Dois tipos de interações podem ocorrer a partir deste contato: interações elásticas, que são aquelas em que os EP não cedem sua energia, apenas mudam sua direção, e as interações inelásticas, que são as mais interessantes para o estudo desenvolvido neste trabalho. Estas se caracterizam pela perda total ou de parte da energia dos EP no momento da colisão. Esta energia transmitida aos elétrons e que possibilita a emissão de elétrons e, por conseguinte, raios X característicos, elétronsretroespalhados (ERE) e elétrons secundários (ES), os quais são responsáveis pelos dados composicionais e topográficos de cada amostra. A técnica de MEV fornece informações de topografia de um dado material, além de composição química qualitativa. Quando EP interagem com os elétrons das camadas mais externas do material, estes absorvem energia e consegue vencer a barreira de potencial que os prendem aos átomos do

material, então são atraídos para um detector acoplado ao equipamento. Geralmente, quase a totalidade dos ES é originária das camadas mais externas dos átomos superficiais do material. Porém, não é somente os elétrons da superfície dos materiais analisados os responsáveis pela formação das imagens micrográficas, existe também a contribuição de elétrons das camadas mais internas que podem se configurar ES. Este fato é bastante raro de ocorrer, pois quanto mais distante da superfície, maior deveria ser a quantidade de energia transportada pelo elétron para vencer os choques com outras espécies ao longo do caminho, bem como a barreira de potencial para escapar da amostra.

Com o auxílio de um detector é possível uma análise composicional das amostras, identificando os elementos químicos presentes no material. Esta técnica contribui com informações indispensáveis na caracterização de fases intermetálicas ordenadas, uma vez que a comprovação da estequiometria remete a eficácia no processo de formação do material inicialmente pretendido. O detector de EDX tem a função de raios X característicos, correspondente a cada elemento químico componente de cada material analisado. Quando elétrons, na sua grande maioria, das camadas mais internas dos átomos superficiais, absorvem certa quantidade discreta de energia, eles saltam dos estados energéticos em que se encontram e conseguem se locomover pelo interior da amostra, vencendo a barreira de potencial que os ligam aos átomos. Devido ao fato destes raios X serem pacotes de energia discretos, eles são específicos de cada elemento da amostra, e dessa forma a técnica de EDX é uma ferramenta essencial na obtenção de dados específicos sobre um material formado a partir de dois ou mais elementos.

2.11.2 Microscopia Óptica (MO)

A Microscopia Óptica constitui uma ferramenta poderosa no campo de caracterização e inspeção de padrões na área da metalografia e da

microeletrônica. Atualmente, sua utilização é bastante ampla e abrange muitas áreas da ciência. Para o caso de materiais sólidos, um estudo da superfície é possível e pode fornecer inúmeras informações qualitativas e quantitativas a respeito da superfície do material analisado.

Com o avanço da eletrônica e engenharia, houve também um aumento no número de modelos de microscópios, os quais oferecem cada vez mais precisão e facilidade de manuseio. De um modo geral, um microscópio é formado por uma parte mecânica e outra parte óptica, de modo que a parte mecânica existe para dar a estabilidade necessária à parte óptica. A parte mecânica constitui a base e o corpo do microscópio, tubos de suporte das lentes e um prato plano com aberturas para o posicionamento das amostras que deverá ser móvel. A parte óptica é constituída de um sistema de lentes oculares e de lentes objetivas, as quais possibilitam a ampliação da região analisada, uma fonte luminosa e um condensador para distribuição da luz emitida pela fonte.

2.11.3 Difração de Raios X (DRX)

Desde a sua descoberta em 1912, por Von Laue, a difração de raios X tem sido uma importante fonte de informação para a ciência e a indústria. A difração de raios X fornece um meio conveniente e prático para a identificação qualitativa e ou quantitativa de compostos cristalinos. O método de difração de raios X usando amostra policristalina é capaz de fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre as fases presentes em uma amostra sólida (Skoog et al., 2002).

A difração de raios X pela rede cristalina ocorre sobre uma larga faixa angular quando o comprimento de onda dos raios X é da ordem do espaçamento entre planos de átomos. A difração de raios X identificará as linhas de difração correspondentes aos espaçamentos interplanares dos materiais cristalinos. O padrão resultante, que é composto de espaçamentos

planares (no eixo x) e intensidades (no eixo y), pode ser comparado a padrões do Comitê de Junta de Padrões de Difração de Pós (JCPDS) da ASTM. Logo, a localização e a intensidade dos picos fornecerão um padrão característico que será utilizado na análise qualitativa. Analisando os picos, pode-se identificar, pelo seu alargamento, diminuição de cristalinidade e alteração de intensidade, e ainda observa-se maior ou menor fração de fases. Porém, o caráter nanométrico das partículas também demonstra alargamento dos picos.

Para uma análise de rotina do pó a difração de raios X fornece as seguintes informações sobre o composto:

- Identidade: Cada fase cristalina tem seu conjunto de picos de difração próprios para ângulos de difração específicos;
- Pureza: Se o composto consiste de uma única fase ou mistura de fases;
- Cristalinidade: Refletindo o tamanho ou perfeição do cristalito derivado do alargamento dos picos de difração;
- Tamanho e forma aproximados: A morfologia dos cristalitos alongados ou equiaxiais podem ser deduzidas;
- Parâmetros de rede: Junto com análise química e espectroscopia, indicam o tipo de substituição na estrutura;
- Orientação.

Embora muitas informações possam ser obtidas pela difração de raios X, a combinação com outros tipos de técnicas apresenta uma visão mais ampla das propriedades físico-química da hidroxiapatita biológica ou sintética. As propriedades de várias hidroxiapatitas, biológicas como sintéticas, têm sido obtidas utilizando-se a difração de raios X e a espectroscopia no infravermelho.

2.11.4 Espectrometria de Raios Infravermelhos por Transformada de Fourier (FTIR)

O princípio de uso dessa técnica se deve ao fato de que as posições relativas dos átomos nas moléculas não são fixas, mas variam continuamente como consequência de uma grande quantidade de diferentes tipos de vibração (modo vibracional da molécula). Quando um material é exposto à radiação infravermelha, transições vibracionais – rotacionais podem ocorrer. Essas transições ocorrem quando a frequência da radiação infravermelha incidente se iguala a frequência de vibração das moléculas que constituem o material. A faixa de energia do espectro eletromagnético que corresponde à radiação infravermelha está compreendida em três regiões:

- infravermelho próximo: 13000 - 4000 cm^{-1} ;
- infravermelho médio: 4000 - 200 cm^{-1} ;
- infravermelho distante: 200 - 10 cm^{-1} .

Um espectro de infravermelho é uma apresentação em duas dimensões das características de absorção de uma molécula que aparecem como bandas ou picos e podem ser descritas em termos de três variáveis: posição, intensidade e forma. O eixo da abscissa (eixo x) corresponde às posições onde as bandas aparecem e são expressas geralmente em termos de comprimento de onda (λ) em micrômetros (μm) ou número de onda (k) em cm^{-1} , que é mais usado. A conversão de comprimento de onda para número de onda é dada pela expressão:

$$K(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})} \times 10^{-4} \quad \text{eq. (22)}$$

A intensidade é dada pela quantidade de energia absorvida pela amostra ao ser exposta a radiação infravermelha que é proporcional ao número de

moléculas que interagem com as radiações observadas. A intensidade é dada em termos de transmitância (T) que mede a razão da potência radiante transmitida (I) pela potência radiante incidente (I_0). A intensidade pode ser também dada em absorbância (A) que é usada em análises quantitativas. A intensidade dos picos nos espectros é uma indicação direta da quantidade do material presente.

$$\text{Transmitância} = \frac{I_0}{I} \quad \text{eq. (23)}$$

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) \rightarrow A = -\log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad \text{eq. (24)}$$

onde, A é a absorbância, I_0 é a intensidade da radiação incidente e I é a intensidade da radiação transmitida. Geralmente o espectro é apresentado em %T, sendo assim, a absorbância é expressa como:

$$A = 2 - \log(\%T) \quad \text{eq. (25)}$$

O espectro de infravermelho é constituído por bandas de absorção que correspondem às frequências de ligações dos átomos das moléculas que compõem o material. A absorção de radiações eletromagnéticas por átomos ou moléculas exige que elas tenham energia apropriada e que haja um mecanismo de interação que permita a transferência de energia. O mecanismo apropriado à excitação vibracional é proporcionado pela variação periódica de dipolos elétricos na molécula durante as vibrações; a transferência de energia ocorre, então, por interação destes dipolos oscilatórios, com o campo elétrico oscilatório da radiação infravermelha, dependendo da frequência (Oréfice et al., 2006).

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula, como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência independentemente da estrutura da

molécula. É justamente a presença de bandas características de grupos, que permite a identificação de estruturas, através de análise do espectro e consulta a tabelas de informações estruturais úteis. A utilização do espectro de infravermelho em conjunto com outros dados espectrais é eficiente para caracterizar a estrutura de moléculas. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos. A frequência de absorção no infravermelho é também comumente usada para obter as constantes de força das ligações.

Rehman et al., (1997) demonstraram a possibilidade de obtenção de bons detalhes de espectros de infravermelho usando a técnica de espectrometria FTIR fotoacústica. Nesse estudo, foram analisados os espectros da fase inorgânica do osso cortical, de hidroxiapatita sintética implantável e de carbonato-apatita sintética. O tipo e as propriedades das carbonato apatitas sintéticas dependem da rota utilizada para a sua obtenção, como a fonte de íons carbonato, a razão molar dos precursores iniciais, o pH e a temperatura de síntese. A substituição do grupo carbonato na estrutura da apatita pode ocorrer sob duas formas distintas: nos sítios trivalentes fosfatos (PO_4^{3-}) formando uma carbonato apatita do tipo B e nos sítios monovalentes da hidroxila (OH^-), formando uma carbonato apatita do tipo A. Podem ocorrer substituições na estrutura do cristal em ambos os sítios, formando-se a carbonato apatita do tipo AB (LeGeros, 1991). Dos espectros, foram obtidos e seus dados são mostrados na Tabela 07.

Tabela 07. Posições das Bandas de Infravermelho observadas por Rehman et al., 1997.

Localização dos picos cm ⁻¹	Osso humano	Osso de carneiro	Carbonato apatita	Hidroxiapatita comercial (P120)
Extensão de hidroxila	--	--	3569	3568
Carbonato v3	1650-1300	1650-1300	1650-1300	1650-1300
----(m)	1609	1609	1649	1648
----(m)	1473	1471	1470	1454
----(m)	1420	1419		1419
Fosfato v3	1190-976	1190-976	1190-976	1190-976
(vs)	--	1096		1092
(s)	--	1085	--	--
(m)	--	1056	--	--
(vs)	1046	--	--	1042
(w)	--	1012	--	--
Fosfato v1 (m)	961	960	960	962
Carbonato v2 (ms)	874	873	873	874
Fosfato v4	660-520	660-520	660-520	660-520
(m)	--	--	--	633
(vs)	605	601	603	602
(vs)	565	579	567	566
Fosfato v2 (w)	467	470	469	472
----(vw)	445	454	--	--

Pela Tabela 07, pode-se observar que o osso humano e o osso de carneiro apresentam resultados quase idênticos. A carbonato apatita sintética tem um espectro próximo ao do osso humano, ao passo que há uma série de diferenças entre os espectros da hidroxiapatita pura e o da carbonato apatita. A diferença mais marcante é o decréscimo no pico de hidroxila localizado em 3568 cm⁻¹, enquanto a hidroxiapatita pura tem picos bem definidos nessa posição. A hidroxiapatita pura possui uma banda de hidroxila em 624 cm⁻¹, que está ausente na carbonato apatita (Rehman et al., 1997).

2.11.5 Área Superficial Específica (BET)

A área superficial específica nos dá um indicativo da reatividade do material. Quanto maior este valor, maior a reatividade e, conseqüentemente, menor o tempo de pega e maior a quantidade de retardante necessária na mistura (Ribeiro, 2006).

Na determinação da superfície de área específica de pós cerâmicos, metálicos ou poliméricos, utiliza-se normalmente o método BET, nome dado em homenagem aos seus idealizadores, Brunauer, Emmet e Teller. O método consiste na absorção física de um gás a baixa temperatura, sendo que a amostra deve passar por um processo de secagem, para então realizar-se o ensaio. Este ensaio é realizado pelo fluxo de um gás inerte que passa rapidamente através da amostra. Em geral, o gás utilizado para esse ensaio é o N_2 no ponto de ebulição (77,4 K) (Brunauer et al., 1938). Quando um sólido é exposto a um gás ou vapor em um sistema fechado à temperatura constante, o sólido passa a adsorver o gás, ocorrendo assim um aumento da massa do sólido e um decréscimo da pressão do gás. Após um determinado tempo, a massa do sólido e a pressão do gás assumem um valor constante. A quantidade de gás adsorvida pode ser calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido (Oliveira, 2008).

Uma das deficiências do método BET tradicional com nitrogênio líquido para determinação da superfície de área de nanopartículas é o tempo gasto para a realização do ensaio e o relativo tamanho das moléculas de N_2 , sendo menos eficaz para medir a superfície de área de nanopartículas. Em geral, para resolver o problema do tamanho das moléculas, substituí-se o nitrogênio (N_2) por hidrogênio (H_2). Por ser uma molécula menor, tem melhor difusão sobre as nanopartículas (Kecskes et al., 2003).

Os processos de adsorção de gás podem ser classificados como físico ou químico, dependendo da natureza das forças atômicas envolvidas. Adsorção química é causada por uma reação química na superfície, já a adsorção física

é causada por forças de interação moleculares e só é importante a uma temperatura abaixo da temperatura crítica do gás. A primeira teoria que relaciona a quantidade de gás adsorvida com a pressão de equilíbrio do gás foi proposta por Langmuir em 1918. Na década de 30, Brunauer, Emmett e Teller derivaram uma equação para a adsorção de gases em multicamadas na superfície de sólidos. A equação, denominada BET, baseia-se na hipótese de que as forças responsáveis pela condensação do gás são também responsáveis pela atração de várias moléculas para a formação de multicamadas (Oliveira, 2008).

Conhecendo o volume da monocamada (V_m), ou seja, o volume ocupado pelas moléculas de gás que formam uma camada monomolecular completa sobre a superfície, é possível determinar a área superficial específica, multiplicando a área ocupada por uma molécula do gás pelo total de moléculas que formam a monocamada, conforme a equação (26) (Ribeiro, 2003).

$$AE = \frac{V_m \cdot NA \cdot A_{ef}}{VM} \quad eq. (26)$$

onde:

- NA é o número de Avogadro $6,023 \times 10^{23}$ moléculas/mol;
- VM é o volume molar ($22,410 \text{ cm}^3/\text{mol}$ a 1 atm e 0°C);
- A_{ef} é a área ocupada por uma molécula do gás. O nitrogênio com uma área de $16,2 \times 10^{-20} \text{ m}^2/\text{moléculas}$ até seu ponto de ebulição

O tamanho médio de partícula é estimado a partir da medida de área de superfície específica, pelo método de BET, utilizando a seguinte equação (Pereira et al., 2003):

$$D = \frac{6}{\rho_T \cdot AE} \quad eq. (27)$$

onde:

- D é o diâmetro médio de partícula (μm);
- ρ_T é a densidade teórica;
- AE é a área superficial (m^2/g).

2.11.6 Tempo de Cura (Pega) dos Cimentos de Fosfato de Cálcio

Em cimentos hidráulicos convencionais, a cura e endurecimento são resultados de uma reação química exotérmica que pode ser de dissolução, precipitação ou hidrólise (Santos, 2002). A pega é identificada como um estágio coloidal durante o desenvolvimento e formação da rede cristalina, inicialmente fraca e tixotrópica, enquanto o processo de endurecimento denota o desenvolvimento de uma estrutura cristalina mais estável e irreversível. Esta teoria geral segue a de Le Chatelier que atribui o endurecimento à cristalização, mas a introdução do conceito de um estágio coloidal inicial tem o mérito de proporcionar explicações de uma variedade de fenômenos associados à medição e pega de cimentos. O tempo durante o qual a pasta de cimento se comporta eminentemente em forma tixotrópica está estritamente relacionado ao tempo disponível para se preparar e fazer a colocação definitiva do cimento. O método utilizado para se medir esse tempo de pega, considerado como o tempo a partir do qual a agulha do aparelho usado não penetra completamente a massa do cimento, é realizado por um aparelho denominado Vicat (Santos, 2002).

Muitos e diferentes métodos de testes são utilizados para caracterizar cimentos injetáveis e materiais para aplicações biomédicas. A maior parte destes métodos, tais como compressão, flexão e de resistência à tração são realizados conforme as normas internacionais ASTM ou ABNT. Geralmente, são adotados dois métodos normalizados para medir o tempo de endurecimento:

a) Agulha Vicat (ASTM C191-92);

b) Agulha Gillmore (ASTM C 266-89).

Ambos são baseados em exame visual, o que os torna subjetivos. Por esse motivo, há uma diferença significativa entre resultados do mesmo material medidos por dois métodos diferentes. Isto vem a ser um problema quando comparados os resultados de diferentes pesquisadores e grupos de pesquisa, o que indica a necessidade de se buscar um novo e objetivo método de medição (Carlson, 2003).

Provavelmente, o método mais efetivo e prático para controlar o tempo de cura seja a adição de certos modificadores químicos na mistura. Se o agente químico adicionado diminui o tempo de cura, ele é conhecido como acelerador, e se aumenta este tempo, ele é chamado de retardador. Agentes ácidos são, via de regra, agentes aceleradores da reação de cura de cimento à base de fosfato tricálcico (Ginebra, et al., 1998).

A utilização de aceleradores de cura em cimentos de fosfato de cálcio ocorre por meio do favorecimento da solubilização dos cristais de fosfato de cálcio, permitindo a saturação do líquido em Ca e P e a precipitação de compostos mais estáveis. Isso ocorre, pois na faixa de pH de aproximadamente 4,2 e acima, a hidroxiapatita é o composto de fosfato de cálcio mais estável ou seja, menos solúvel (Chow *et. al.*, 1991). Existe uma diferença entre a solubilidade da fase α -TCP e da fase β -TCP. A fase α -TCP é bastante solúvel no organismo vivo enquanto a fase β -TCP possui um tempo de degradação maior devido a sua maior estabilidade química. No entanto, comparadas com a hidroxiapatita, ambas as fases do fosfato tricálcico apresentam solubilidade muito maior.

As características do pó também são de suma importância e influenciam sobremaneira na reação de cura. Partículas pequenas possuem grandes áreas superficiais e freqüentemente aglomeram formando partículas secundárias, a

fim de minimizar a superfície total ou a energia interfacial do sistema. A aglomeração refere-se à adesão de partículas que ocorre devido às forças de atração de van der Waals. Normalmente, uma massa aglomerada pode ser desaglomerada por meio de uma dispersão em meio líquido. Já a agregação, por outro lado, refere-se a partículas que interagem mais fortemente, tornando difícil a quebra da massa agregada em partículas primárias (Toniolo, 2004).

Dada a cura do cimento, tem-se a formação da microestrutura resultante caracterizada pela presença de poros. Existem dois tipos de porosidade em qualquer corpo: a porosidade fechada e a porosidade aberta ou aparente, conforme esquematizado na Figura 15.

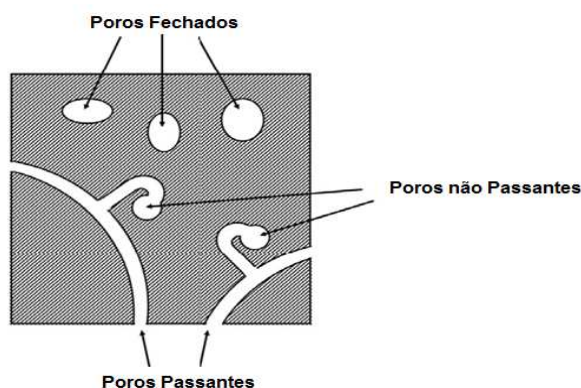


Figura 15. Representação esquemática dos tipos de porosidade possíveis de serem encontradas em um corpo cerâmico (Alves, 2005).

Poros fechados normalmente não podem ser detectados, a porosidade é geralmente caracterizada com a porosidade aberta ou aparente, que se relacionam aos poros intercomunicáveis que têm acesso à superfície.

A porosidade aparente pode ser definida como a fração entre o volume de espaços vazios e o volume total da amostra (volume ocupado somente pelo sólido acrescido do volume de vazios).

A porosidade aparente não só é mais fácil de ser medida experimentalmente, se comparada com a fechada, como também, em muitos casos, é de significativa relevância para a osseointegração de materiais biocompatíveis, pois afeta diretamente sua osteocondutividade. No entanto, é

bem conhecida a dependência da resistência mecânica dos materiais cerâmicos com a porosidade. Assim, existe um compromisso é necessário entre estas duas propriedades.

2.11.7 Resistência Mecânica

Os materiais cerâmicos são geralmente pouco resistentes em condições de tração direta. Quando submetidos a este tipo de esforço, as trincas microscópicas existentes nos materiais tendem a se propagar e se orientar perpendicularmente ao eixo de tração (Garcia; Spim; Santos, 2000). Por outro lado, a maioria das cerâmicas é muito resistente à compressão, uma vez que não rompe por deslizamento e, portanto, apresenta comportamento relacionado às suas forças interatômicas (Van Vlack, 1973).

O ensaio de resistência a tração indireta por compressão diametral, conhecido como “Ensaio Brasileiro” (Neto, 2000), tem sido usado por diversos autores na caracterização da resistência mecânica dos cimentos de fosfatos de cálcio com o objetivo de avaliar a tensão de tração máxima suportada por uma amostra, antes da ruptura (Carrodéguas, 2000).

O ensaio de tração por compressão diametral consiste em comprimir o material até este se romper, porém a carga é aplicada em sentido radial (Figura 16). A principal dificuldade para realizar o ensaio é assegurar a perfeita distribuição da carga em toda a linha de aplicação, ou seja, o corpo de prova deve ter uma perfeita geometria cilíndrica e ser isento de qualquer rugosidade superficial (Marion, et al., 1997).

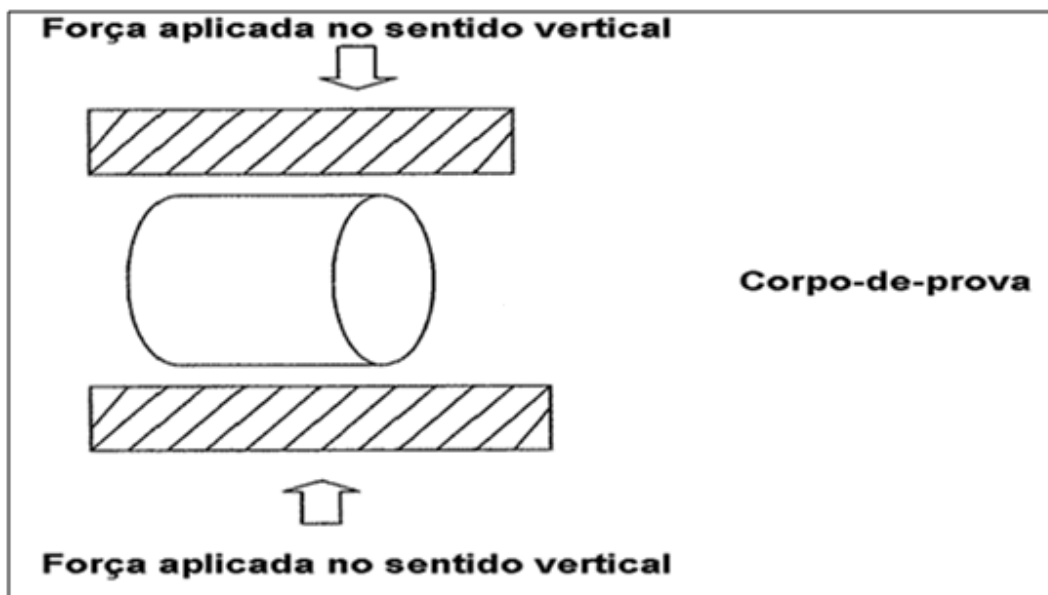


Figura 16. Corpo-de-prova submetido a uma força axial para dentro, distribuída de modo uniforme em toda área diametral da amostra (Spim et al.,2000).

São utilizados corpos-de-prova cilíndricos com relação comprimento/diâmetro entre 1 e 2.

A compressão de um cilindro entre duas placas planas gera a tensões trativas e compressivas, dependendo da posição e direção de observação na amostra. O trincamento ocorrerá na tensão trativa máxima, ao longo do diâmetro carregado, conforme Figura 17.

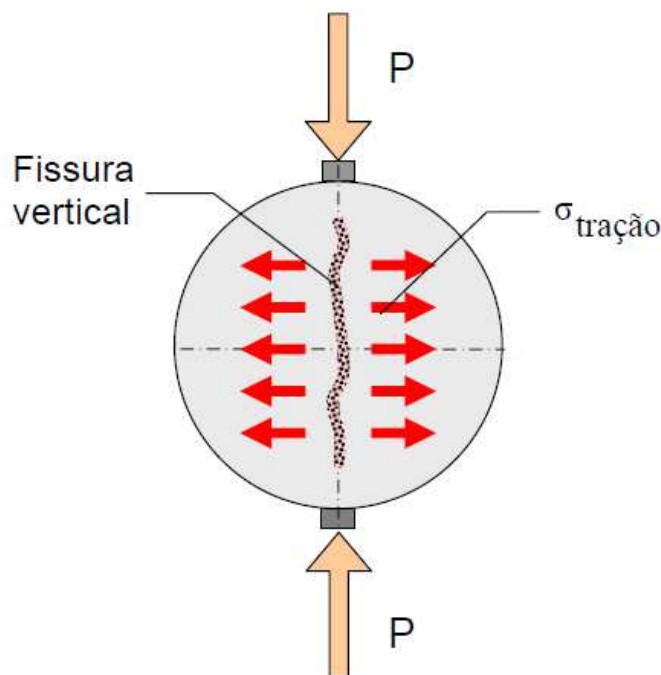


Figura 17. Distribuição de tensão e secção transversal em uma amostra submetida a ensaio de compressão diametral (Stanley, 2001).

As tensões compressivas máximas ocorrem na superfície da amostra, imediatamente sob as cargas. Fraturas devido às tensões compressivas são, portanto, esperadas na superfície, e aparecerão como trincamento local. Se este trincamento não for ampliado, a área de contato aumentará, a fratura ocorrerá por tensões trativas ou cisalhantes. A falha devido às tensões cisalhantes, freqüentemente conduz a um padrão de fratura irregular. A falha por tração pode ser identificada como uma fratura ao longo do diâmetro carregado, deixando duas metades de cilindro com dimensões semelhantes (Kamst, et al., 1999).

Uma distribuição de carga correta é importante para o teste de compressão diametral. A carga aplicada deve ser igualmente distribuída ao longo do comprimento do cilindro. Se a área de contato entre a amostra e os pratos da prensa for pequena, ocorrerá concentração da carga, conduzindo a tensões compressivas e cisalhantes máximas. Isto pode conduzir a uma falha por tensões cisalhantes. Uma grande área de contato afeta a tensão trativa no

centro.

Para materiais que tendem a romper devido às tensões cisalhantes, uma distribuição de carga adequada é freqüentemente acompanhada pela introdução de uma “almofada” (talisca) estreita de um material macio entre a amostra e os pratos da prensa.

A tensão de tração no plano de carregamento é obtida a partir da seguinte expressão (Stanley, 2001).

$$\sigma_T = \frac{2P}{\pi DL} \quad eq. (26)$$

onde, σ_T (Pa) é a tensão trativa, P (N) é a carga aplicada, D (m) é o diâmetro do cilindro, L (m) é a comprimento do cilindro.

Os resultados de ensaios de compressão são influenciados pelas mesmas variáveis de ensaios de tração (temperatura, taxa de deformação, anisotropia do material, tamanho de grão, porcentagem de impurezas e condições ambientais).

2.11.8 Espectroscopia de Absorção Óptica no Ultravioleta/Visível

A espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), ou espectrofotometria, utiliza fótons na faixa do ultravioleta próximo (UV: $200 < \lambda < 380-400$ nm), do visível (Vis: $380-400 \text{ nm} < \lambda < 700-800$ nm), e do infravermelho próximo (NIR, do inglês, *near infrared*: $800 \text{ nm} < \lambda < 3300$ nm). Esses fótons (nesta faixa de energia) interagem com as moléculas promovendo a transição de elétrons do estado fundamental para estados eletrônicos excitados. Essas transições ocorrem entre níveis de energia eletrônicos. Um elétron é promovido de um orbital ocupado para um orbital não ocupado de maior energia. Geralmente, a

transição ocorre do orbital ocupado mais alto (HOMO – *Highest occupied molecular orbital*) para o orbital molecular não ocupado mais baixo (LUMO – *lowest unoccupied molecular orbital*). Assim, ocorre absorção de radiação quando a energia for igual à diferença de energia entre dois estados eletrônicos. A espectroscopia de absorção óptica compara a intensidade de um feixe de luz transmitido através de uma amostra com a intensidade incidente.

A Figura 18 mostra uma solução absorvente de concentração c dentro de uma cubeta de caminho óptico b , passando por ela um feixe de radiação de intensidade I_0 (feixe incidente). Após passar pela amostra (feixe emergente), a intensidade passa a ser I (Skoog, et al., 2002).

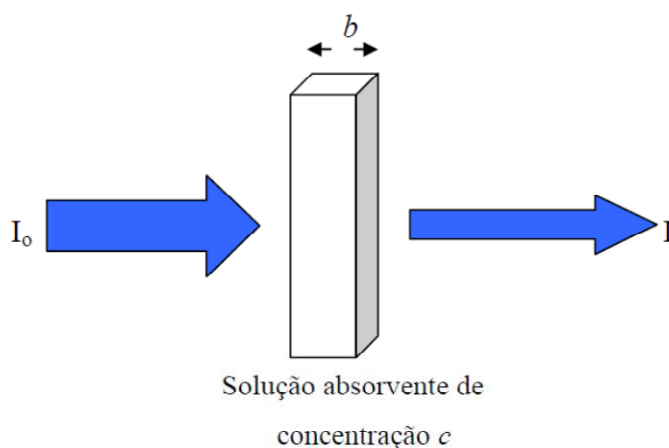


Figura 18. Atenuação do feixe de radiação por uma solução absorvente (Skoog et al., 2002).

Quanto maior o número de moléculas capazes de absorverem luz de um dado comprimento de onda, e quanto mais efetivamente cada uma dessas moléculas absorverem a luz, maior será a intensidade da absorção naquele comprimento de onda. A partir dessas idéias, a expressão empírica seguinte, conhecida como lei de Lambert-Beer, pode ser formulada (Banwell *et al.*, 1994):

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = abc \quad \text{eq. (27)}$$

onde, A é absorvância, I_0 é a intensidade da radiação incidente na amostra, I é a intensidade da radiação que deixa a amostra, a é a absorvância molar característica, b é o comprimento óptico percorrido (largura da amostra em cm) e c é a concentração molar do soluto.

O termo $\log\left(\frac{I_0}{I}\right)$ é também conhecido como densidade óptica na literatura mais antiga. A absorvância molar é uma propriedade da molécula que sofre uma transição eletrônica e não é uma função dos parâmetros variáveis envolvidos na preparação da solução.

O instrumento usado na espectroscopia UV/Vis é chamado de espectrofotômetro. Um espectrofotômetro típico consiste de uma fonte de luz, um monocromador e um detector. A fonte de luz é geralmente uma lâmpada de deutério ou xenônio, que emite radiação eletromagnética na região UV do espectro. Uma segunda fonte de luz, geralmente uma lâmpada de tungstênio, é usada para comprimentos de onda na região visível do espectro. O monocromador é uma rede de difração; sua função é separar o feixe de luz em seus comprimentos de onda constituintes. Um sistema de fendas focaliza o comprimento de onda desejado sobre a amostra. Para se obter informação sobre a absorção de uma amostra, ela é inserida no caminho óptico do aparelho. A luz UV e/ou visível atravessa o dispersor (prisma) e, a seguir, passa pela fenda da radiação luminosa. Essa luz monocromática passa pela amostra e chega a uma célula fotomultiplicadora. Esta emite um sinal amplificado que vai para um registrador. O dispersor gira, causando uma variação contínua no comprimento de onda da luz empregada. O registrador traça, então, um gráfico da absorvância em função do comprimento de onda (λ). Obtém-se, pois, o espectro da absorção ultravioleta/visível da substância em análise. Este mostra bandas de absorção, que tem como principais características o comprimento de onda em que ocorre o máximo de absorção (λ_{max}) e a intensidade da absorção (Kaufmann, 2003).

Amostras translúcidas ou contendo partículas provocam espalhamento da luz, podendo ser analisadas por refletância difusa. O fenômeno da refletância difusa ocorre quando a luz incide numa superfície, onde a radiação penetra e,

subsequentemente, reaparece na superfície do sistema, resultado da absorção parcial e espalhamento múltiplo dentro do sistema. Nesse caso, o caminho do feixe muda de direção várias vezes à medida que passa através da amostra. A refletância difusa é dependente da composição do sistema, análogo à absorção da luz. Obtém-se a refletância total da amostra a partir de uma linha de base (100% de refletância) traçada com a refletância do BaSO₄, material quase totalmente refletor colocado na posição da referência (Kaufmann, 2003).

A preparação de amostras para espectroscopia UV-Vis é simples. Para amostras líquidas normalmente empregam-se cubetas, que podem ser de vidro para a região visível e de quartzo para a região abaixo de 330 nm (Kaufmann, 2003). As amostras sólidas são analisadas através do acessório de esfera de integração.

2.12 Planejamento e Análise de Experimentos Fatoriais

Em decorrência das necessidades da sociedade moderna, a pesquisa científica tem promovido grandes avanços em todos os campos da ciência, gerando uma gama crescente de dados e informações, sendo que para a devida exploração e o correto entendimento, a aplicação de ferramentas estatísticas torna-se indispensável (Pereira Filho et al., 2002).

O planejamento experimental, também denominado delineamento experimental, representa um conjunto de ensaios estabelecido com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo.

Para que os resultados obtidos de ensaios experimentais possam ser analisados através de métodos estatísticos, possibilitando elaborar conclusões objetivas, o planejamento experimental deve ser baseado numa metodologia também estatística, que é a única forma objetiva de avaliar os erros experimentais que afetam esses resultados.

Em pesquisas básicas e tecnológicas, técnicas de planejamento de experimentos conduzidos no esquema fatorial têm sido cada vez mais aplicadas. A grande vantagem de sua utilização é o teste de várias hipóteses em um mesmo experimento, incluindo a possibilidade de obtenção de conclusões mais amplas face ao estudo simultâneo de vários fatores.

Para se realizar um planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis independentes a serem estudadas e os valores em que essas variáveis serão testadas, denominados níveis. A seguir, efetuam-se experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados para as variáveis ou fatores em estudo. Esses experimentos são utilizados para pesquisar não somente diferenças nas respostas provenientes de variações nos níveis dos fatores, denominadas de efeitos principais, mas também o modo como a escolha do nível de determinado fator interfere nos efeitos dos demais fatores, que consistem nos efeitos de interação entre os fatores.

Experimentos são testes onde são feitas variações propositais nas variáveis de entrada ou de controle de um processo, com o objetivo de se observar e identificar as razões de variação da resposta ou variável de saída. Experimentos fatoriais são aqueles que consideram todas as combinações possíveis dos diversos níveis dos fatores ou variáveis que o constituem, sendo que os níveis de um fator correspondem aos valores que este fator pode assumir durante a experimentação.

Os experimentos devem ser realizados seguindo-se os princípios básicos da experimentação, que são aleatoriedade da ordem dos ensaios, com o objetivo de minimizar os efeitos de interferências tendenciosas, como por exemplo, o efeito da variação da temperatura ao longo do dia (Piratelli Filho, 1997); repetição, realizada para se estimar a variabilidade existente dentro de uma mesma condição experimental; e divisão da unidade experimental em blocos, dentro dos quais as condições experimentais são mais homogêneas que as condições do experimento completo.

A aleatoriedade da ordem da experimentação pode ser obtida selecionando-se aleatoriamente a condição experimental a ser testada, toda

vez que for ser realizada uma observação. Se a condição experimental sorteada já tiver sido testada, descarta-se o sorteio e repete-se o processo até que todas as observações sejam coletadas. A inclusão de réplicas, ou repetições do experimento, aponta a variabilidade decorrente de fontes de variação não controladas, como mudanças em condições de testes e erros de medidas, permitindo a obtenção de uma estimativa do erro experimental (Plackett e Burman, 1946). A estimativa dessa variabilidade experimental não controlada pode ser feita através de desvios padrões amostrais de testes repetidos.

Uma vez obtidos os dados, segue-se a análise dos mesmos. Para isso são utilizadas técnicas estatísticas, como o quadro de análise de variância (ANOVA). A significância dos efeitos de interação entre os fatores também é determinada através da análise de variância.

2.12.1 Análise de Variância (ANOVA)

A análise de variância (ANOVA) consiste em uma técnica estatística para comparação simultânea de várias médias, provenientes de amostras distintas. O método ANOVA é utilizado para aceitar ou rejeitar, estatisticamente, as hipóteses investigadas durante a realização de experimentos (Vieira, 2006).

O propósito básico de um teste de significância é comparar uma estimativa do efeito de um tratamento ou amostra com a estimativa do erro aleatório. Considerando-se que o erro aleatório é desprezível, é possível através dessa comparação estabelecer se o efeito do tratamento em questão é ou não significativo. Para isso faz-se uso do teste de hipótese. Um teste de hipótese estatístico, como por exemplo, o teste F das variâncias amostrais, é um critério que conduz à decisão de se aceitar ou rejeitar a hipótese em consideração, a partir de valores experimentais obtidos das amostras.

Como as conclusões derivadas de testes de hipótese baseiam-se em curvas de distribuição de probabilidades, dois tipos de erros podem ser

cometidos, denominados erro do tipo I e erro do tipo II. O erro do tipo I ocorre ao se aceitar a hipótese inicial H_0 quando esta é falsa. A probabilidade de se cometer um erro desse tipo pode ser controlada pela seleção da confiança estatística desejada na realização do teste de hipóteses. Dessa forma, se a confiança escolhida for de 99%, a probabilidade de se aceitar uma hipótese falsa é de 1%, que é igual ao nível de significância do teste, denominado de α .

A rejeição de H_0 , quando esta é uma hipótese verdadeira é conhecida como erro do tipo II. A probabilidade de se cometer um erro desse tipo depende do tamanho da amostra, do desvio padrão amostral e da magnitude da diferença entre médias necessária para se aceitar a hipótese nula, segundo a qual as médias são diferentes. Amostras muito pequena podem levar a um erro do tipo II, principalmente quando a diferença observada entre as médias for muito pequena.

A validade de testes estatísticos de significância depende da existência de réplicas, pois estas fornecem uma estimativa do erro aleatório e tornam possível o uso de tabelas de significância, construídas sob a consideração de que os erros são independentes.

No método ANOVA, considera-se que qualquer observação aleatória possui três componentes: o efeito comum, o efeito do tratamento e o erro aleatório. O efeito comum é um valor constante presente em todas as observações. O efeito do tratamento consiste de uma parcela fixa ou aleatória, que varia de acordo com a condição experimental considerada. Quanto ao erro, trata-se de uma quantidade aleatória não previsível, cujo valor esperado é zero.

O modelo matemático que descreve a origem da variação em cada uma das observações tomadas aleatoriamente de uma população dividida em k tratamentos é dado pela eq. (28).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij} \quad \text{eq. (28)}$$

onde:

- Y_{ij} = *i*-ésima observação aleatória do *j*-ésimo tratamento;
- μ = efeito comum ou média da população;
- τ_j = efeito devido ao tratamento *j*;
- ε_{ij} = erro aleatório na *i*-ésima observação do *j*-ésimo tratamento.

Sendo μ_j a média do tratamento *j*, o efeito do tratamento *j* (τ_j) é dado pela diferença entre a média do tratamento *j* e a média da população, de acordo com a eq. (29), e o erro aleatório na *i*-ésima observação do *j*-ésimo tratamento é dado pela diferença entre o valor da observação e a média do tratamento ao qual pertence a observação em questão, conforme eq.(30).

$$\tau_j = \mu_j - \mu \quad \text{eq. (29)}$$

$$\varepsilon_j = y_{ij} - \mu_j \quad \text{eq. (30)}$$

A Tabela 08 resume as notações e o formato utilizado para organização dos dados necessários à aplicação do método de análise de variância ANOVA (Garcia Diaz e Phillips, 1995).

Tabela 08. Notações e organização dos dados para aplicação do método ANOVA (Garcia Diaz e Phillips, 1995).

	Tratamentos					
	j = 1	j = 2	j = 3	...j	j = m-1	j
= m						
Y _{1m}	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y _{1j}	Y _{1,m-1}	
Y _{2m}	Y ₂₁	Y ₂₂	Y ₂₃	Y _{2j}	Y _{2,m-1}	
.
.
Y _{r_{m,m}}	Y _{r_{1,1}}	Y _{r_{2,2}}	Y _{r_{3,3}}	Y _{r_{j,j}}	Y _{r_{m-1,m-1}}	
Total	T ₁	T ₂	T ₃	T _j	T _{m-1}	
T _m						
Tamanho da amostra	r ₁	r ₂	r ₃	r _j	r _{m-1}	
r _m						
Média amostral	Ȳ ₁	Ȳ ₂	Ȳ ₃	Ȳ _j	Ȳ _{m-1}	
Ȳ _m						

Sejam as definições:

$$total\ geral = T = \sum_{j=1}^m T_j \quad eq. (31)$$

$$número\ total\ de\ observações = N = \sum_{j=1}^m r_j \quad eq. (32)$$

$$média\ total = \bar{Y} = \frac{T}{N} \quad eq. (33)$$

O desvio total $Y_{ij} - \mu$ (eq.34) pode ser dividido em duas parcelas: o desvio

da média do tratamento j em relação à média total da população, ou seja, τ_j , e o desvio da i -ésima observação do j -ésimo tratamento em relação à média do tratamento correspondente, denominado de ε_{ij} .

$$Y_{ij} - \mu = \tau_j + \varepsilon_{ij} \quad \text{eq. (34)}$$

Como os parâmetros populacionais não são conhecidos, utilizam-se os valores amostrais estimados de acordo com as definições apresentadas nas eq. (31), (32) e (33) para obtenção do desvio total, que dessa forma pode ser expresso por

$$Y_{ij} - \bar{Y} = (\bar{Y}_j - \bar{Y}) + (Y_{ij} - \bar{Y}_j) \quad \text{eq. (35)}$$

Para levar em consideração apenas a magnitude da variação independentemente do sinal algébrico, calculam-se os quadrados das diferenças, conforme eq. (36).

$$(Y_{ij} - \bar{Y})^2 = (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 + (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 + 2(\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) \quad \text{eq. (36)}$$

Somando-se em i e j , tem-se

$$\begin{aligned} \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y})^2 &= \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 + \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 + \\ &+ \sum_j \sum_i 2(\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) \end{aligned} \quad \text{eq. (37)}$$

O último termo da eq. (37) é nulo, como pode ser visto pela eq.(38).

$$\begin{aligned} \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) &= \sum_j (\bar{Y}_j - \bar{Y}) \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j) = \\ &= \sum_j ((\bar{Y}_j - \bar{Y})(r_j \bar{Y}_j - r_j \bar{Y}_j)) = 0 \end{aligned} \quad eq. (38)$$

Definindo-se as seguintes somas de quadrados:

$$SQ_{total} = \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y})^2 \quad eq. (39)$$

$$SQ_{tratamento} = \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 \quad eq. (40)$$

$$SQ_{erro} = \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 \quad eq. (41)$$

pode-se escrever a equação fundamental da análise de variância (eq. 42).

$$SQ_{total} = SQ_{tratamento} + SQ_{erro} \quad eq. (42)$$

Introduzem-se então três estatísticas adicionais, denominadas de quadrados médios, definidas como o quociente entre cada soma de quadrados e seu respectivo grau de liberdade (*GL*). O número de graus de liberdade consiste em uma medida da independência dos valores utilizados para determinação de uma estatística.

$$QM_{total} = \frac{SQ_{total}}{N - 1} \quad eq. (43)$$

$$QM_{tratamento} = \frac{SQ_{tratamento}}{m - 1} \quad eq. (44)$$

$$QM_{erro} = \frac{SQ_{erro}}{N - m} \quad \text{eq. (45)}$$

O quadrado médio total (QM_{total}) representa a variância total dos dados. O número de graus de liberdade total (GL_{total}) é calculado pelo número total de observações menos um, $N - 1$, em virtude da restrição imposta pelo cálculo da média total (Y), que implica na perda de um grau de liberdade.

Da mesma forma, os quadrados médios $QM_{tratamento}$ e QM_{erro} representam estimativas das variâncias entre tratamentos e dentro de cada tratamento, respectivamente, obtidas dividindo-se as somas de quadrados pelos respectivos números de graus de liberdade. Como o objetivo é comparar as variâncias entre tratamentos, o quadrado médio que representa a variação dentro do tratamento ou amostra é chamado de erro experimental.

O número de graus de liberdade entre tratamentos, ou entre amostras, é igual ao número de tratamentos menos um ($GL_{tratamentos} = m - 1$) e o número de graus de liberdade dentro de cada tratamento, ou dentro de cada amostra, é igual ao número de tratamentos vezes o número de réplicas por tratamento menos um, ou seja $GL_{erro} = m \times (r - 1)$. O número de graus de liberdade dentro do tratamento ou amostra pode também ser calculado pela diferença entre o número de graus de liberdade total ($GL_{total} = N - 1$) e o número de graus de liberdade entre tratamentos ($GL_{tratamentos} = m - 1$), obtendo-se dessa forma $GL_{erro} = N - m$.

A comparação das variâncias entre tratamentos é feita comparando-se valores de quadrados médios, admitindo-se uma hipótese inicial H_0 de que as médias dos tratamentos ou amostras são diferentes ($H_0 \neq \bar{Y}_1 \neq \bar{Y}_2 \neq \dots \neq \bar{Y}_m$). Se o quadrado médio entre tratamentos apresentar valor bem superior ao quadrado médio dentro dos tratamentos, a hipótese de pesquisa, segundo a qual as médias comparadas são iguais, poderá ser rejeitada, confirmando-se a hipótese nula H_0 .

Essa comparação deverá ser feita com rigor matemático, fundamentando-

se na teoria da probabilidade (Carpinetti, 2000). A estatística utilizada para testar diferenças entre médias é a “estatística F ”, determinada pela razão entre dois quadrados médios ou duas variâncias, conforme eq. (46), na qual v_1 representa o grau de liberdade do quadrado médio 1 (QM_1) e v_2 , o grau de liberdade do quadrado médio 2 (QM_2).

$$F_{v_1, v_2} = \frac{QM_1}{QM_2} \quad eq. (46)$$

O teste F de Snedecor baseia-se na comparação do valor de F calculado a partir dos resultados observados (eq.47) com valores de F tabelados, obtidos a partir de uma distribuição de probabilidades da razão entre variâncias de duas amostras, extraídas aleatoriamente de uma mesma população com distribuição normal. São tabelados valores de F em função do nível de significância e dos graus de liberdade das variâncias do numerador e do denominador (v_1 e v_2 , respectivamente). O nível de significância α é igual a um menos o nível de confiança adotado. Níveis de significância usualmente aceitos são $\alpha = 0,01$; $0,05$ ou $0,1$, correspondentes a níveis de confiança ou probabilidades de 99%, 95% e 90%, respectivamente (Piratelli Filho, 1997). Dessa forma, o valor de F tabelado é representado na forma F_{α, v_1, v_2} , sendo denominado de valor crítico de F .

$$F_{m-1, N-m} = \frac{QM_{tratamento}}{QM_{erro}} \quad eq. (47)$$

Se o valor de F calculado for maior do que o valor tabelado pode-se afirmar com uma confiança de $[(1 - \alpha) 100]\%$ que as médias são diferentes e portanto aceita-se a hipótese nula.

O resumo dos resultados da análise de variância geralmente mostra-se no formato apresentado na Tabela 09.

Tabela 09. Quadro de análise de variância (ANOVA)

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma de quadrados (SQ)	Quadrado médio (QM)	Razão entre QM (F)
Varição entre tratamentos	$m - 1$	$SQ_{tratamento}$	$QM_{trat} = \frac{SQ_{trat}}{m - 1}$	$F = \frac{QM_{trat}}{QM_{erro}}$
Varição dentro de cada tratamento (erro)	$N - m$ ou $m \times (r - 1)$	SQ_{erro}	$QM_{erro} = \frac{SQ_{erro}}{N - m}$	
Varição total	$N - 1$	SQ_{total}		

Para que os resultados obtidos da análise de variância sejam válidos, é necessário que os dados apresentem distribuição normal e que as variâncias dentro das amostras sejam aproximadamente iguais. Além disso, as variáveis devem ser aleatórias.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo constitui-se da descrição metodológica da síntese de pós de fosfato de cálcio em solução aquosa, produção de biocimentos e suas técnicas de caracterização, como também o estudo da liberação de fármacos na matriz de fosfato de cálcio desenvolvida durante este trabalho.

Para a realização deste trabalho, optou-se pela utilização da fase beta (β) do sistema fosfato tricálcio (β -TCP) como fase desejável, pois o mesmo possui características biocompatíveis e biodegradáveis.

Os reagentes que foram utilizados no desenvolvimento desta pesquisa estão listados a seguir:

- Hidróxido de Cálcio - Ca(OH)_2 – PA (Merck, Lote: 38493147)
- Acido Fosfórico (Orto) - H_3PO_4 – 85% PA (Merck, Lote: K39541273)
- Ácido Láctico - $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ – 95% (Merck, Lote: K40190566)
- Hidróxido de Amônio - NH_4OH – 28 – 30% (Synth, Lote 125953)
- Sulfato de Cálcio Dihidratado - $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – PA (Merck, Lote: A0007261)
- Ampicilina Trihidratada (Winlab, Lote: 31410026)
- Água deionizada.

3.1 Síntese dos Pós de Fosfato de Cálcio

O resumo das etapas efetuadas na síntese dos pós é apresentado na Figura 19.

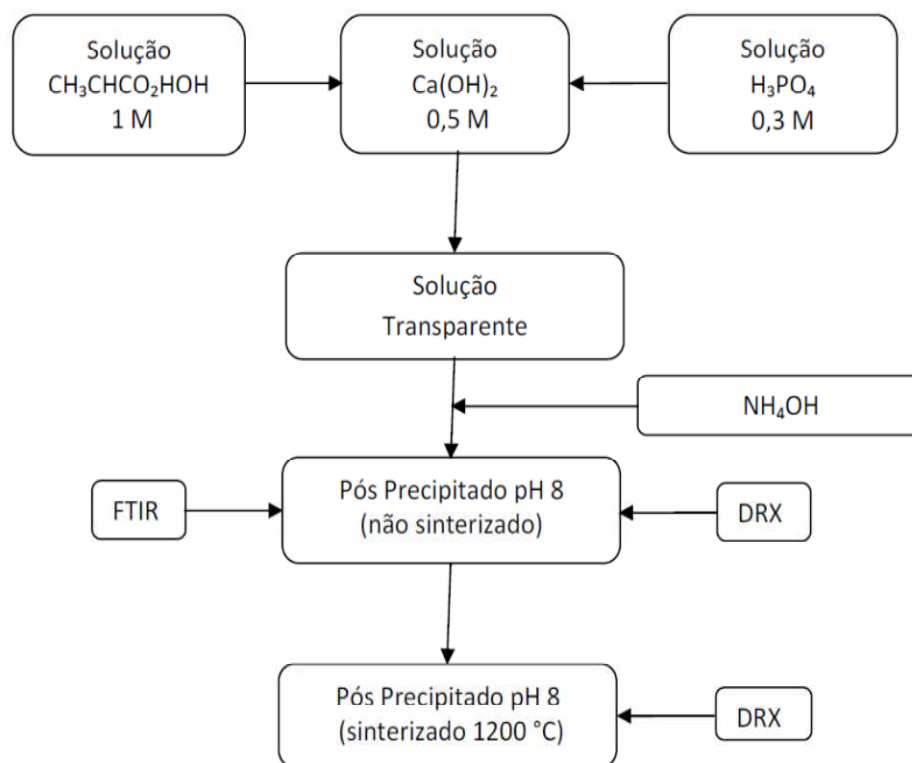
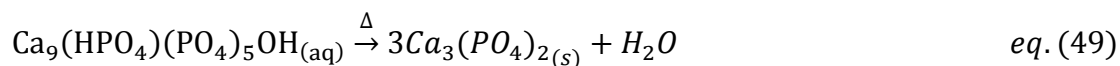
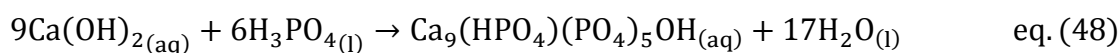


Figura 19. Fluxograma das etapas utilizadas para a obtenção e caracterização dos pós antes e após a sinterização.

A solução utilizada para obtenção de β -TCP tem a seguinte composição: 0,5M de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 0,3M de H_3PO_4 e 1M de $\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{HOH}$. Em um béquer contendo a solução 0,5M $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sob agitação constante, foi adicionada a solução 1M $\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{HOH}$. Em seguida, a solução 0,3M H_3PO_4 foi lentamente adicionada ao béquer contendo a mistura de soluções. A adição de ácido fosfórico foi controlada de modo a atingir vazão aproximadamente constante de 8 ml/min. Após a adição de H_3PO_4 , a solução no béquer foi mantida sob agitação constante à temperatura ambiente durante o período de 1 hora. A solução assim preparada é denominada solução transparente. NH_4OH foi adicionado à solução transparente para a precipitação de pós em pH 8.

Após a adição de NH_4OH , as suspensões foram precipitadas e envelhecidas durante 24 horas. Ao término do período de envelhecimento, os precipitados foram filtrados em funil de Buchner utilizando papel de filtro médio em sistema de vácuo adicionando-se abundantemente água deionizada para a retirada do excesso de NH_4OH . Os pós foram secos em estufa a 80°C por 24 horas e, em seguida, desagregados em um almofariz de ágata. Em seguida, os pós foram sinterizados em temperaturas de 1200°C durante 1 hora, a uma taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$, em forno mufla, obtendo-se o β -TCP conforme as seguintes reações:



Os resultados de caracterização das análises: difração de raios X, espectro de infravermelho e BET dos pós encontram-se detalhados no Apêndice A.

3.2 Preparação de Biocimentos de Fosfato de Cálcio

O principal desafio na preparação do biocimento foi a determinação adequada de uma relação líquido/pó que não comprometesse a cura do biocimento. Aditivos podem ser utilizados para reduzir a quantidade de líquido necessária para a obtenção de uma pasta com viscosidade ideal para sua utilização como cimento. Os parâmetros utilizados foram manuais e visuais, procurando-se obter uma pasta coesa, porém não líquida, possibilitando a moldagem dos corpos de prova. A relação considerada ideal foi de 0,8 mL/g, dentro dos valores encontrados na literatura (Bohner, et al., 1996).

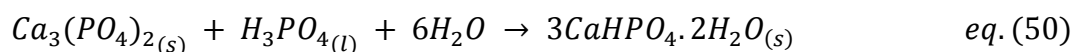
O aditivo utilizado neste trabalho foi escolhido através de uma análise dos

aditivos já empregados na literatura. Decidiu-se pela utilização do sulfato de cálcio di-hidratado (CSD) por provocar um retardamento no tempo de endurecimento do cimento, de acordo com relatos de Bohner et al (1996).

Bohner e colaboradores (1996) mostraram que os cristais de sulfato de cálcio atuam como nucleadores para o fosfato de cálcio dihidratado (DCPD; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), que é o produto da reação de pega deste sistema de biocimento. Singh (2000) também observou aumento da resistência à compressão e diminuição do tempo de pega de composições de cimento Portland acrescidas de gesso (sulfato de cálcio di-hidratado).

Segundo Mirtchi e colaboradores (1989), a presença de sulfato de cálcio favorece a precipitação de fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD) no mesmo hábito cristalino (agulhas) em composições de cimento baseado no β -TCP, aumentando a resistência mecânica das composições.

Os biocimentos foram obtidos adicionando à fração de aditivo correspondente a formulação a ser ensaiada em um almofariz de ágata contendo pó (β -fosfato tricálcio sintetizado em laboratório). Logo após, realizou-se a homogeneização manual da mistura, com auxílio de uma espátula, para se obter a melhor dispersão e distribuição do CSD no β -TCP, por um período de tempo de 30 segundos. Em seguida, a mistura foi transferida para um becker onde foi adicionado o líquido (solução de ácido fosfórico) com concentração 2,0 M.



Após 3 minutos, a mistura resultante foi transferida para moldes de polímero Teflon[®] em formato de cilindros (Figura 20) com 6 mm de altura e 12 mm de diâmetro. Os corpos-de-prova foram desmoldados (Figura 21) após 24 horas de pega e deixados em temperatura ambiente.

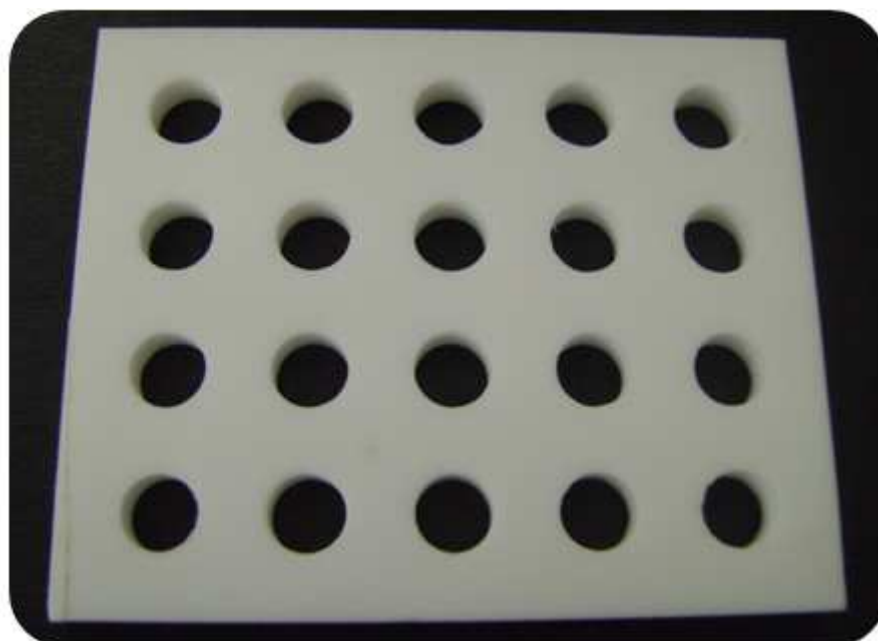


Figura 20. Molde de Teflon® - Cilindros para análise de compressão diametral.



Figura 21. Corpos de prova cilíndricos 12 mm x 6 mm.

Foram preparadas amostras sem aditivo a fim de se verificar os efeitos de cada adição de sulfato de cálcio nas propriedades do biocimento, servindo como base para comparação.

A Figura 22 mostra o fluxograma das etapas empregadas na produção dos biocimentos.

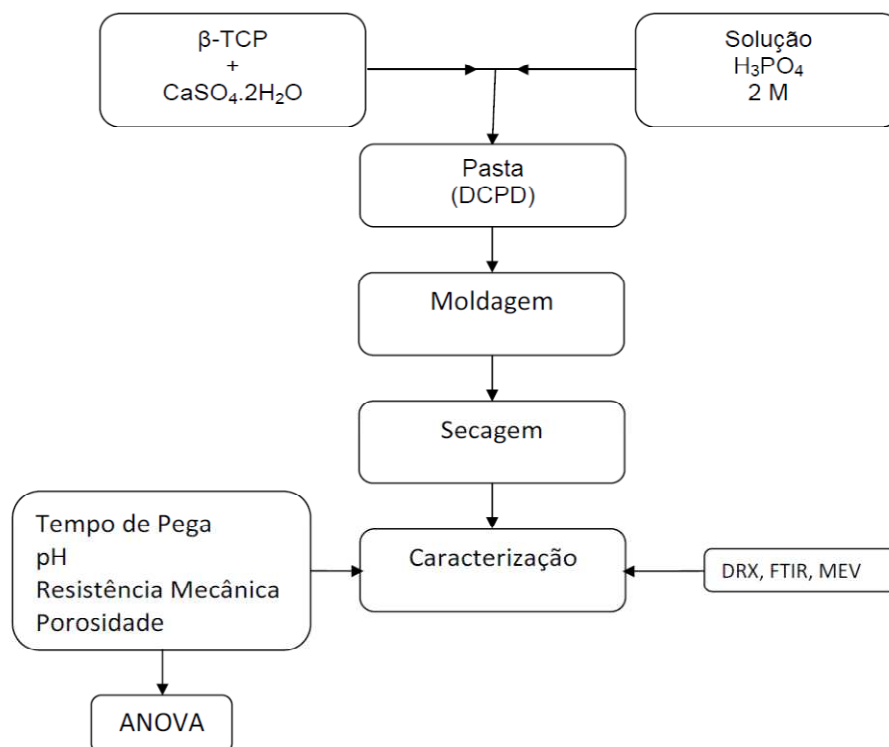


Figura 22. Fluxograma das etapas utilizadas para a obtenção dos biocimentos.

3.3 Preparação de Biocimentos de Fosfato de Cálcio Impregnado com Fármacos

Os biocimentos incorporados com fármacos foram preparados adicionando ampicilina em quantidade equivalente a 1% do peso total da amostra na pasta resultante da mistura sólido-líquido, mantendo a mesma relação L/P antes especificada. Em seguida, foi feita uma nova homogeneização com auxílio de uma espátula de aço inoxidável. Após 3 minutos, a pasta foi transferida para os moldes onde ficaram 24 horas em temperatura ambiente para secar. Decorrido este tempo, as amostras foram desmoldadas e acondicionadas em frascos plásticos.

A Figura 23 mostra o fluxograma das etapas empregadas na produção de biocimentos incorporados com droga.

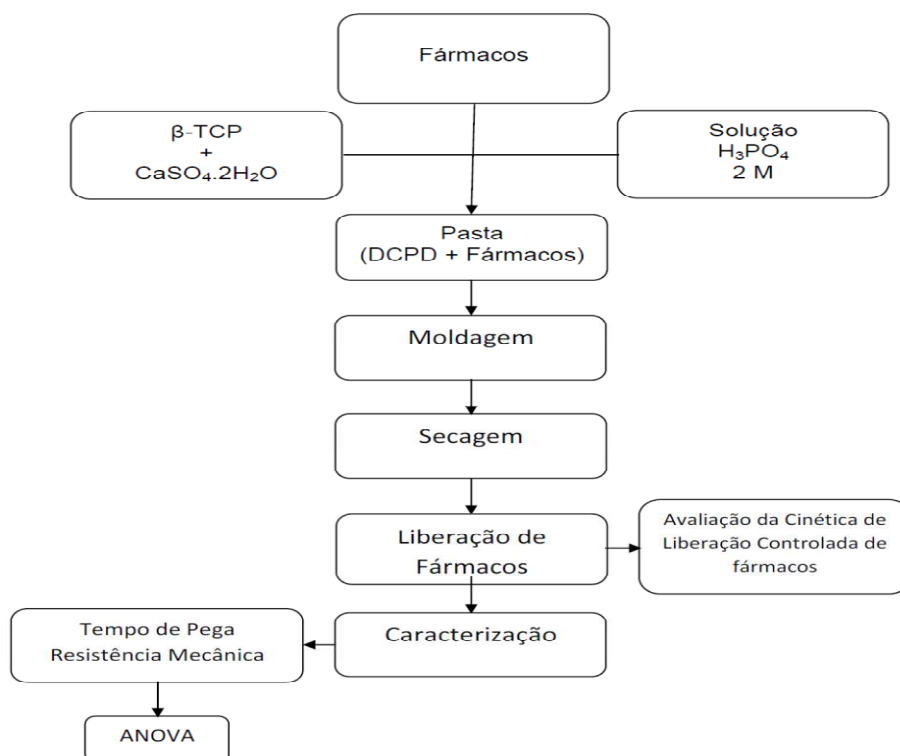


Figura 23. Fluxograma das etapas utilizadas para a obtenção dos biocimentos incorporados com fármaco.

3.4 Caracterização dos Pós e dos Biocimentos

3.4.1 Difração de raios-X (DRX)

As amostras foram caracterizadas por difração de raios X em um difratômetro Philips X'Pert X-ray Diffraction System com tubo de cobre θ -2 θ com CuK α ($\lambda = 0,1542$ nm) operando com uma voltagem de 40 KV e uma corrente de 40 mA. Os difratogramas foram obtidos varrendo a faixa de 20° - 60° para os pós e de 5° - 60° para os biocimentos. A análise de DRX permitiu a identificação das fases cristalinas presentes no material, portanto o tipo de fosfato formado. A técnica não é destrutiva e utiliza apenas pequenas quantidades da amostra. A identificação das fases foi realizada utilizando o programa *X'Pert HighScore Plus*.

3.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier das amostras foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Nicolet 800 associado a uma célula MTech PAS. Os espectros foram obtidos a 128 varreduras em resolução de 4 cm^{-1} . A câmara de amostras da célula PAS foi evacuada com gás hélio e seca empregando-se percloroeto de magnésio como agente desumidificante. Os pós e os biocimentos foram misturados em KBr, prensados na forma de pastilhas e analisados por técnica de transmitância, adotando intervalos de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$. Isto possibilita a caracterização dos grupos funcionais característicos presentes nas amostras.

3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise microestrutural dos biocimentos foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura Philips modelo XL-30 com amostras fixadas em um suporte com fita de carbono dupla-face. As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro utilizando em sistema de deposição a vácuo Bal-Tec. A microscopia permitiu obter dados sobre a morfologia e tamanho das partículas formadas.

3.4.4 Determinação da Distribuição do Tamanho de Partículas (BET)

Determinação da área superficial específica foi realizada pelo método de Brunauer, Emmet e Teller (BET). Esta técnica consiste na adsorção física de um gás (comumente N_2). A área superficial específica foi determinada adotando o método de adsorção gasosa (Quantachrome Instruments modelo Autosorb-1C), utilizando gás N_2 como adsorvedor. Conhecendo o valor da área de superfície específica é possível estimar o tamanho médio das partículas

utilizando a equação:

$$DET_{BET} = \frac{6}{\rho_T \cdot AE_{BET}} \quad eq. (51)$$

onde, DET_{BET} é o diâmetro médio das partículas (nm), ρ_T é a densidade teórica do material e AE_{BET} a área superficial (m^2/g).

3.4.5 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH) dos Biocimentos

As amostras obtidas de acordo com o descrito anteriormente foram submersas em um becker contendo água deionizada à temperatura constante de 37° C, com uma relação líquido/sólido 10:1. O becker foi mantido submerso durante 24 horas e ao final desse tempo foi determinado o pH das amostras em um pH-Metro digital marca QUIMIS, modelo Q-400A. Antes de cada medida o pH-Metro foi calibrado com soluções tampão Merck para pH 4 e 7. Todas as medidas de pH foram realizadas em triplicata.

3.4.6 Tempo de Pega (Cura)

Os tempos de pega inicial e final dos biocimentos foram determinados em um aparelho de Vicat modificado, com base na norma NBR 12128 (Figura 24). Nesta técnica, a mistura recém homogeneizada é vertida em um recipiente e colocada com a placa base no aparelho de Vicat modificado, situado sob o tronco cônico. Foi anotado o tempo contado a partir do instante em que o líquido e o pó entra em contato. O tronco cônico foi descido suavemente até a superfície da pasta no molde. Logo após, foi solto em intervalos de tempo crescentes. No momento em que sua ponta ativa deixava de penetrar

totalmente na pasta, foi anotado o tempo. O próximo estágio no processo de cura foi medido vertendo o molde cheio sobre a placa base, de forma que os ensaios para a determinação do fim de pega fossem realizados na face oposta do corpo-de-prova, que estava originalmente em contato com a placa base. Em seguida, o tempo foi anotado. Para a realização das medidas, foi utilizado o procedimento descrito acima. O tempo final do processo foi considerado como aquele em que o tronco cônico deixou somente marcas ligeiramente perceptíveis na superfície da peça cerâmica.



Figura 24. Aparelho de Vicat Adaptado.

3.4.7 Porosidade dos Biocimentos

A porosidade de um material afeta suas propriedades físicas e conseqüentemente seu comportamento no ambiente próximo a ele. O termo porosimetria é freqüentemente usado para compreender as determinações de tamanho de poro, distribuição, volume, densidade e outras características relacionadas à porosidade de um material. A adsorção e permeabilidade, energia, densidade e outros fatores influenciados pela porosidade de uma substância determinam a maneira e a condição nas quais estas podem ser

usadas apropriadamente.

As medidas de porosidade aparente foram obtidas por meio do método de Arquimedes. Este método é baseado em medidas de massa da amostra quando seca e após permanecer imersa em água durante 24 horas.

Para os cálculos de densidade (DA) e porosidade aparente (PA) foram utilizadas as seguintes equações:

$$PA(\%) = \frac{M_u - M_s}{M_u - M_i} \times 100 \quad \text{eq. (52)}$$

onde, M_s é a massa seca da amostra (g), M_u é a massa da amostra úmida, M_i é a massa da amostra imersa em água e ρ é a densidade da água na temperatura em que foi realizada a medida.

3.4.8 Resistência Mecânica

A resistência mecânica dos biocimentos e dos biocimentos incorporados com droga foi determinada pelos ensaios de resistência à compressão diametral. As amostras foram preparadas em lotes de 3 (cada). As amostras foram ensaiadas após pega de 24 horas. Os testes foram realizado em um equipamento universal, marca Instron, modelo 4443, com velocidade de 1 mm/min, utilizando cilindros de 6 mm de diâmetro e 12 mm de altura. Um detalhe do ensaio de compressão diametral mostrando a operação utilizada para as amostras preparadas nesta pesquisa pode ser visualizado na figura 25.

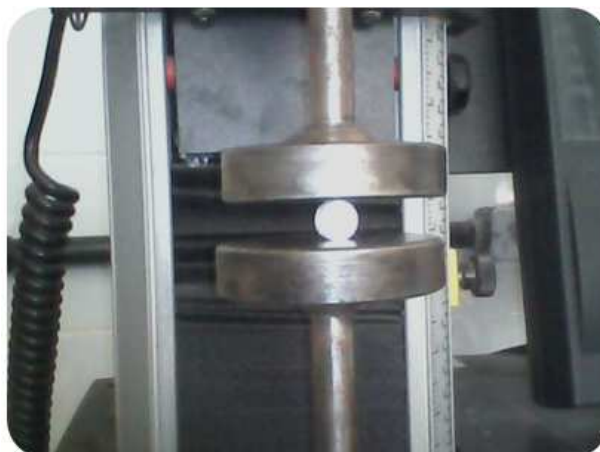


Figura 25. Sistema do ensaio de tração por compressão diametral.

3.4.9 Microscopia Óptica

A análise por microscopia óptica teve como objetivo à caracterização física das superfícies dos materiais investigados. Foram utilizados equipamentos de Microscopia Óptica Olympus, modelos BX51M e CH30 com câmeras fotográficas digitais marcas *Pixel Link* e *Bel*, modelos PL-A662 e DV-5000. As amostras foram posicionadas sobre as lâminas dos microscópios. Em seguida, foi regulado o feixe de luz sobre a superfície do material, bem como a resolução pretendida. Para a micrografia resultante citada neste trabalho, foi tomado em media, um numero de três micrografias, a partir das quais os programas *Image-Pro Express* e *Bel MicroImage Analyzer* capturou as regiões melhores definidas e gerou a micrografia final.

3.4.10 Análise Estatística

Os dados obtidos foram sujeitos a tratamento estatístico em duas etapas. A primeira foi a análise descritiva dos resultados, com a construção de gráficos que permitiram visualizar as principais tendências observadas e a segunda foi

a análise específica de cada uma das variáveis, onde foi utilizado o teste ANOVA (Análise de Variância de fator único), que teve como objetivo comparar se as médias aritméticas entre os tratamentos eram estatisticamente significantes e o procedimento de múltiplas comparações de Tukey- Kramer, para determinar quais dentre as médias aritméticas eram significativamente diferentes (Vieira, 2006). Caso a diferença absoluta nas médias aritméticas das amostras seja maior do que o intervalo crítico, o par específico é considerado significativamente diferente (Levine, et al., 2008).

Embora o teste de ANOVA de fator único seja relativamente robusto com respeito ao pressuposto de variância igual nos tratamentos, grandes diferenças nas variâncias dos tratamentos podem afetar seriamente o nível de significância. Então, para testar a homogeneidade da variância foi utilizado o teste de Levene (Vieira, 2006). No apêndice D, podem ser observadas as tabelas com os resultados.

Através da revisão da literatura sobre propriedades dos biocimentos, notou-se claramente que certas variáveis são fundamentais na determinação do procedimento experimental adotado. Desta forma, as variáveis selecionadas estão descritas a seguir:

- Tempo de cura inicial;
- Tempo de cura final;
- pH;
- Resistência mecânica;
- Porosidade.

3.4.11 Estudo da Liberação Controlada de Fármacos

O estudo da liberação de fármaco, bem como a taxa e o mecanismo predominante foi realizado *in vitro*. As amostras obtidas de acordo com o descrito anteriormente foram presas em um fio de platina e submersas em um

becker com temperatura constante de 37° C, contendo 100 ml de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, sob agitação constante 50 rpm. Alíquotas de 1 ml foram retiradas em determinados períodos de tempo, e repostas com solução tampão. As alíquotas foram diluídas para 2 ml com PBS e, para estimar a quantidade de ampicilina liberada, mediu-se a absorbância, utilizando uma cubeta de quartzo e comprimento de onda de 215 nm, em um espectrofotômetro de UV-Visível Termo Scientific modelo Biomate 3. A curva de calibração apresentada na figura 26 possibilitou que a quantificação da concentração do fármaco fosse realizada durante as medidas. Para a curva de calibração diluiu-se uma solução de ampicilina (1 mg/ml) para concentrações variando entre 0,001 e 1 mg/ml.

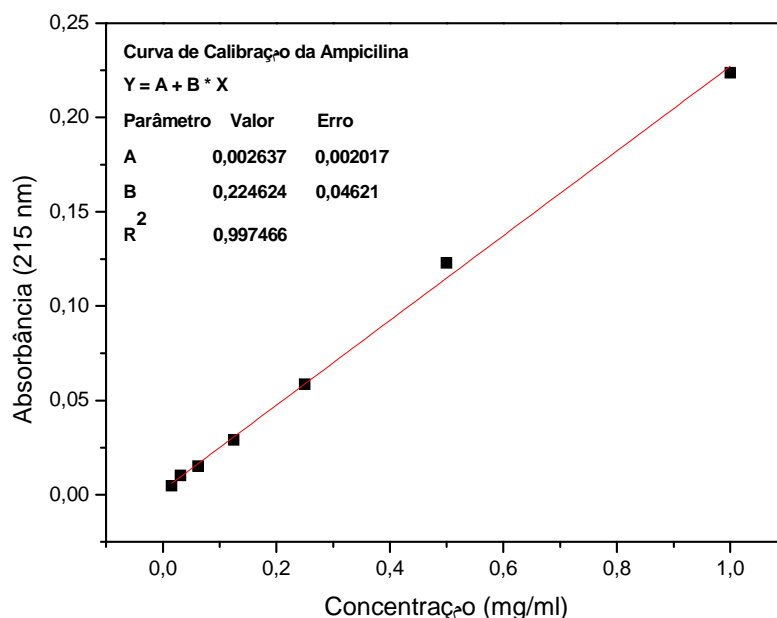


Figura 26. Curva de calibração da ampicilina.

Devido às diluições subseqüentes da solução tampão em que foi liberada a ampicilina, tornou-se necessário corrigir a quantidade de massa obtida pelas leituras no espectrofotômetro utilizando a seguinte equação (Ogawa e Plepis, 2002):

$$M_n = m_n - (m_{n-1} \times 0,99) + M_{n-1} \quad \text{eq. (53)}$$

onde,

- M_n = massa de antibiótico presente na solução no momento da retirada da alíquota;
- m_n = massa de antibiótico considerando-se a diluição de vido à reposição com tampão;
- M_{n-1} = massa de antibiótico obtida na leitura imediatamente anterior.

3.4.12 Avaliação da Cinética de Liberação Controlada de Fármacos

Os dados obtidos dos perfis de liberação controlada foram submetidos a tratamentos matemáticos para a determinação de cinética de liberação, para isso foram aplicados dois modelos matemáticos, os quais descrevem a liberação do fármaco incorporado na matriz: Modelo de Higuchi, Modelo de Korsmeyer – Peppas (ANEXO C).

Para estes tipos de sistemas, as equações que descrevem o modelo de liberação dependem da geometria da amostra e da superfície exposta (Carrodeguas, 2000).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados de maior pertinência, obtidos no decorrer da pesquisa. Resultados quanto aos materiais de partida, quanto à metodologia, são relatados na sua íntegra e comparados com dados já descritos na literatura. A essência da argumentação teve forte embasamento da revisão bibliográfica apresentada.

Os biocimentos de fosfato tricálcico foram sintetizados em laboratório utilizando-se a metodologia reportada por Bohner et al., (1997) e Carrodéguas (2000). Para a obtenção da quantidade total de cimento de fosfato tricálcico necessária para a confecção de todos os corpos-de-prova repetiu-se esta metodologia. Os materiais obtidos foram caracterizados quanto ao tempo de pega, densidade e porosidade, pH e resistência mecânica.

Para facilitar a análise dos resultados das diferentes formulações propostas neste trabalho, as mesmas foram nomeadas segundo as iniciais do nome biocimento e biocimento com fármaco seguido de dois dígitos numéricos correspondentes à sua respectiva fração em massa de aditivo incorporado (sulfato de cálcio dihidratado), ou seja, BC-00, BC-10, BC-30, BC-50, BCF-00, BCF-10, BCF-30 e BCF-50. A Tabela 10 apresenta as formulações dos biocimentos estudados.

Tabela 10. Formulações de biocimentos de fosfato de cálcio modificados.

Biocimento	L/P(ml/g)	β -TCP(%)	CSD (%)	Ampicilina (%)	Líquido
BC- 00	0,8	100	-	-	H ₃ PO ₄ - 2M
BC- 10	0,8	90,91	9,09	-	H ₃ PO ₄ - 2M
BC- 30	0,8	76,92	23,08	-	H ₃ PO ₄ - 2M
BC- 50	0,8	66,67	33,33	-	H ₃ PO ₄ - 2M
BCF- 00	0,8	99,01	-	0,99	H ₃ PO ₄ - 2M
BCF- 10	0,8	90,01	9,00	0,99	H ₃ PO ₄ - 2M
BCF- 30	0,8	76,16	22,85	0,99	H ₃ PO ₄ - 2M
BCF- 50	0,8	66,01	33,00	0,99	H ₃ PO ₄ - 2M

4.1 Caracterização Físico-Química

4.1.1 Resultados de Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X dos biocimentos após a reação de pega estudados neste trabalho são apresentados nas Figuras 27, 28, 29, e 30, que mostram os resultados da análise qualitativa das fases presentes.

No difratograma do biocimento BC-00 (Figura 27) foram identificados os picos referentes às fases fosfato de cálcio di-hidratado (Brushita - DCPD) como fase majoritária, na composição CaHPO₄.2H₂O, ficha cristalográfica JCPDS: 009-0077 e a fase β -fosfato tricálcio (β -TCP) na composição Ca₃(PO₄), sendo os picos mais intensos os correspondentes à primeira fase, como era esperado, segundo a eq. 50.

É importante salientar que a fase β -TCP presente nos difratogramas de todos os biocimentos se deve ao fato de que para obter uma pasta de fácil manipulação e um biocimento mais resistente, utiliza-se uma quantidade de ácido ortofosfórico inferior à estequiométrica. Por isso, a formulação utilizada geralmente é deficiente em ácido ortofosfórico, provocando a não reação total

do β -Fosfato Tricálcio.

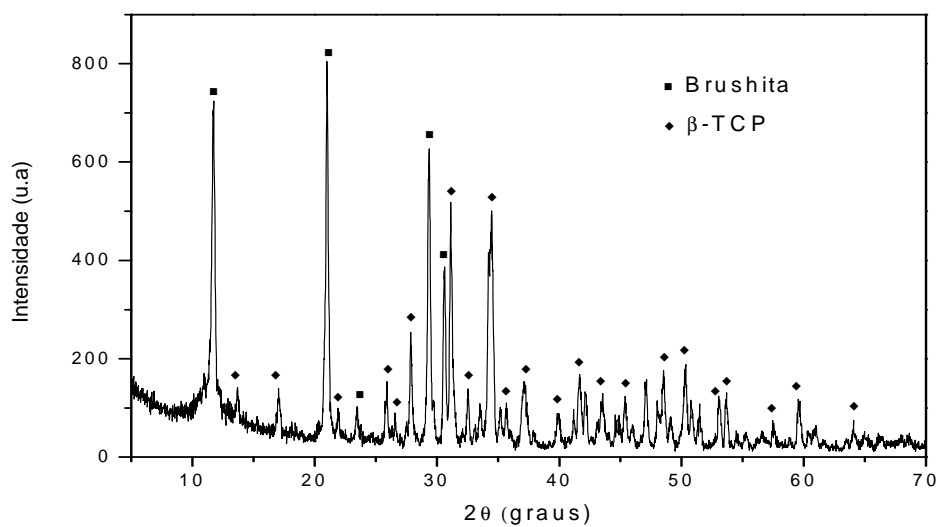


Figura 27. Difratoograma de raios X para o biocimento BC-00.

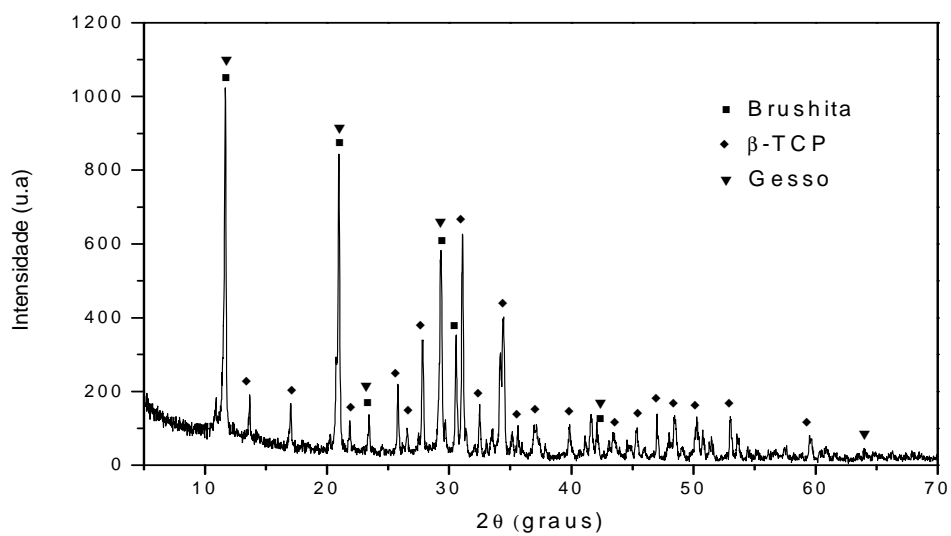


Figura 28. Difratoograma de raios X para o biocimento BC-10.

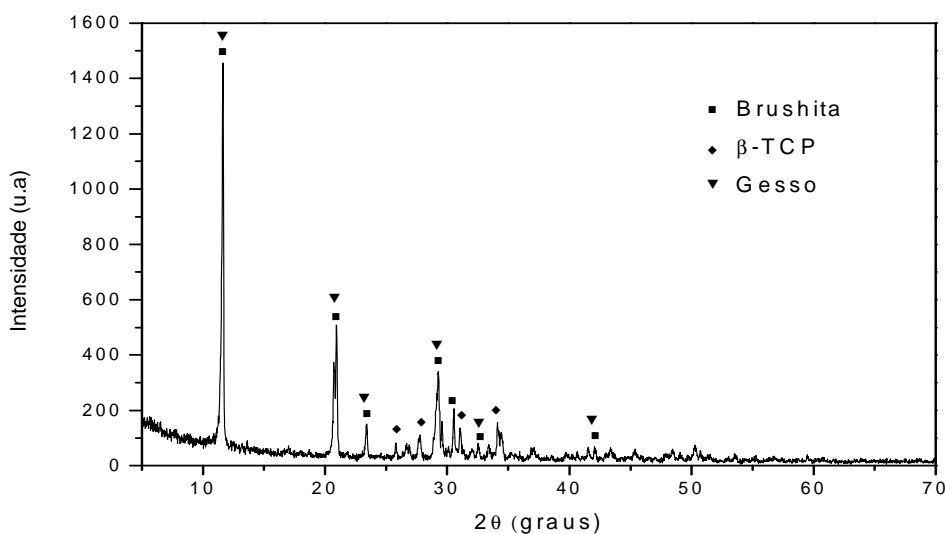


Figura 29. Difratoograma de raios X para o biocimento BC-30.

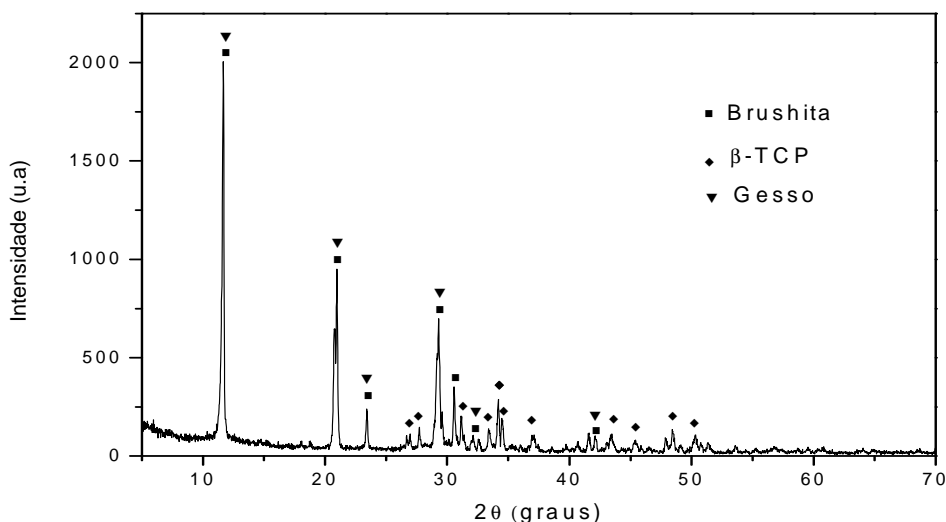


Figura 30. Difratoograma de raios X para o biocimento BC-50.

O pó do biocimento BC-10 apresentou um difratograma semelhante ao mencionado para o biocimento sem aditivo (Figura 28). Porém, foram identificados picos referentes à fase sulfato de cálcio di-hidratado (Gesso - CSD) na composição $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ficha cristalográfica JCPDS 033-0311. Também foi observada certa redução da intensidade dos picos da fase β -TCP e

um aumento da intensidade dos picos correspondentes das fases DCPD e CSD. Isso, provavelmente, se deve ao aumento da quantidade de líquido utilizado, proporcional à quantidade de sulfato de cálcio di-hidratado na composição fazendo com que a fase β -TCP reaja formando uma maior quantidade de brushita. O mesmo quadro se repetiu para o caso dos biocimentos BC-30 e BC-50, como mostram as Figuras 29 e 30.

Em estudo semelhante realizado por Santos (2002), que adicionou sulfato de cálcio hemi-hidratado, também foi observado um aumento da intensidade dos picos de difração correspondentes à fase sulfato de cálcio di-hidratado (CSD), com a consequente redução da intensidade das fases de fosfato de cálcio, com o aumento da quantidade de (CSH) adicionado.

4.1.2 Resultados de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Análise complementar com a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier feita na região do infravermelho intermediário, ou seja, de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} identificou as bandas mais significativas em relação ao fosfato de cálcio e ao sulfato de cálcio, como indicado nas Figuras 31, 32, 33 e 34. Além disso, identificou também bandas referentes a alguns grupos funcionais adsorvidos nas amostras. A banda larga que aparece na região entre 3700 e 2600 cm^{-1} está associada à água fisicamente adsorvida. A banda em torno de 1649 cm^{-1} é derivada do modo de deformação das moléculas de água $\nu_2(\text{H}_2\text{O})$. A região entre $700 - 500\text{ cm}^{-1}$ apresenta bandas em 529 cm^{-1} , referentes ao modo de deformação anti-simétrica dos fosfatos $\nu_4(\text{PO}_4^{-3})$. A banda em 983 cm^{-1} é devida ao estiramento simétrico dos fosfatos $\nu_1(\text{PO}_4^{-3})$.

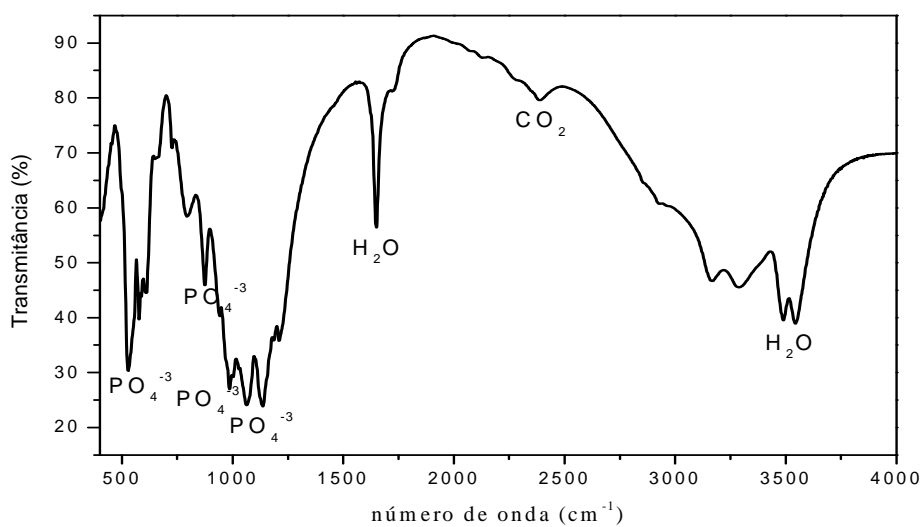


Figura 31. Espectroscopia de Infravermelho do biocimento BC-00.

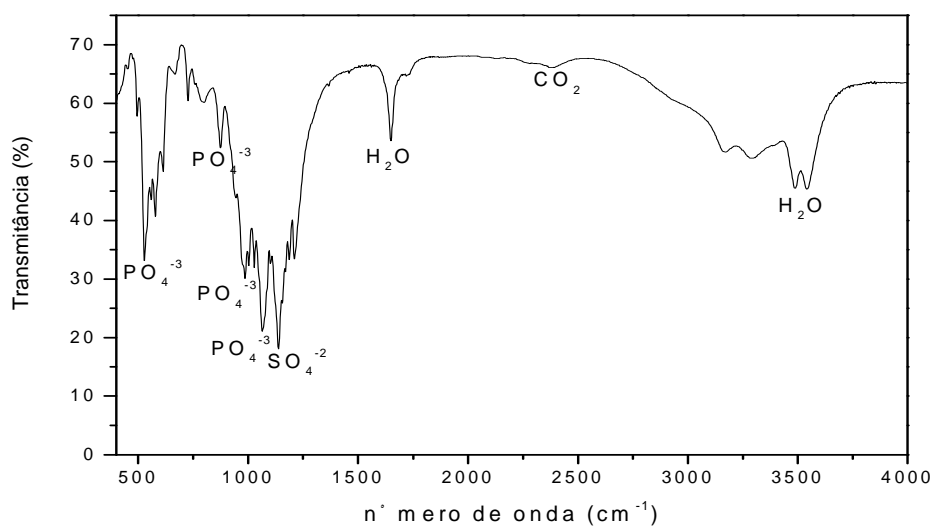


Figura 32. Espectroscopia de Infravermelho do biocimento BC-10.

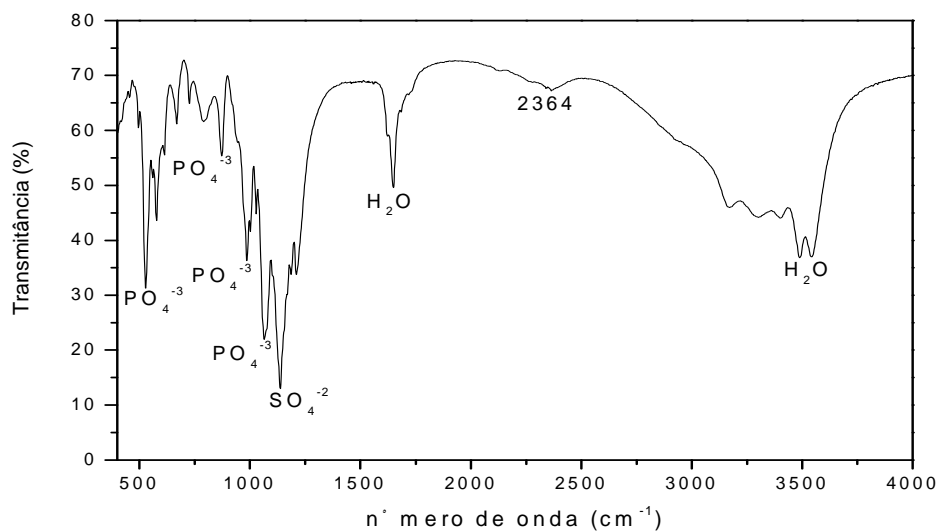


Figura 33. Espectroscopia de Infravermelho do biocimento BC-30.

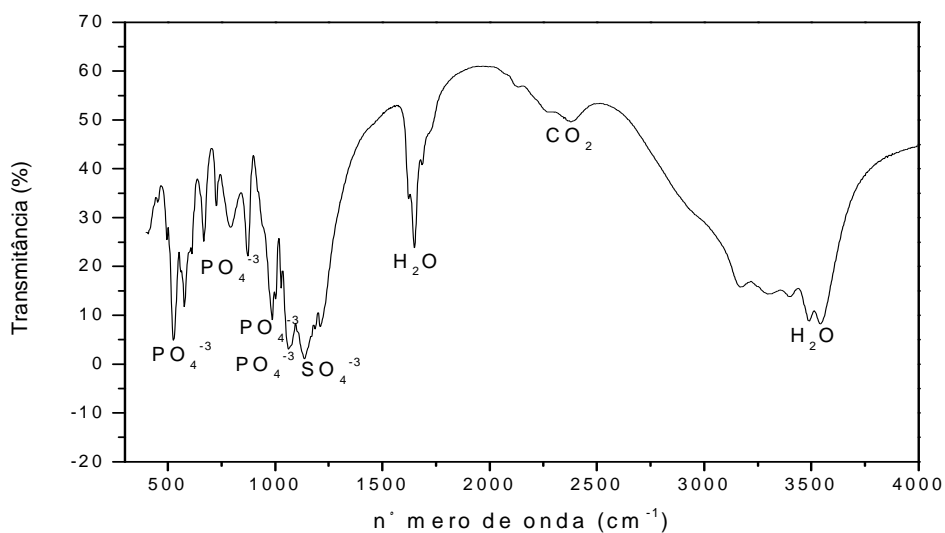


Figura 34. Espectroscopia de Infravermelho do biocimento BC-50.

Nos espectros das amostras BC-10, BC-30 e BC-50, foram identificadas bandas de absorção de SO_4^{-3} características do sulfato de cálcio. O modo de vibração dos íons SO_4^{-3} em 1063 e 1040 cm^{-1} aumenta de intensidade com a incorporação do sulfato de cálcio como mostram as Figuras 32 - 34. Observa-

se que as bandas tornam-se mais estreitas com o aumento do teor do aditivo no biocimento. Essas modificações na forma das bandas indicam um aumento na cristalinidade desses materiais.

O grupo funcional OH e grupos funcionais relativos ao CO também estão presentes nas amostras, indicando a presença de moléculas de H₂O e CO₂ que podem ter se originado do ambiente atmosférico e/ou estar adsorvidas na superfície do material. Estas podem ser oriundas de impurezas presentes nos reagentes ou de carbonização da água destilada utilizada para a formação das soluções dos reagentes. É difícil conseguir um material CaP sem contaminação por CO₂ durante o preparo da solução, a reação de síntese, a separação, a lavagem e secagem do material sem condições especiais (Cheng, 1998).

4.2 Caracterização Morfológica e Microestrutural

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os estudos de caracterização pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, realizados nas a superfícies de fratura das amostras evidenciaram, para as diferentes composições, uma morfologia formada por fragmentos de cristais de diferentes formas e tamanhos, conforme ilustrado nas Figuras 35, 37, 39 e 40. Foi utilizada ampliação de 1000 X e a captura das imagens ocorreu de forma aleatória.

A micrografia de superfície das amostras dos biocimentos BC-00 mostra a presença de grandes cristais de DCPD em forma de placas envolvidas por partículas aglomeradas de β -TCP, como mostra a Figura 35.

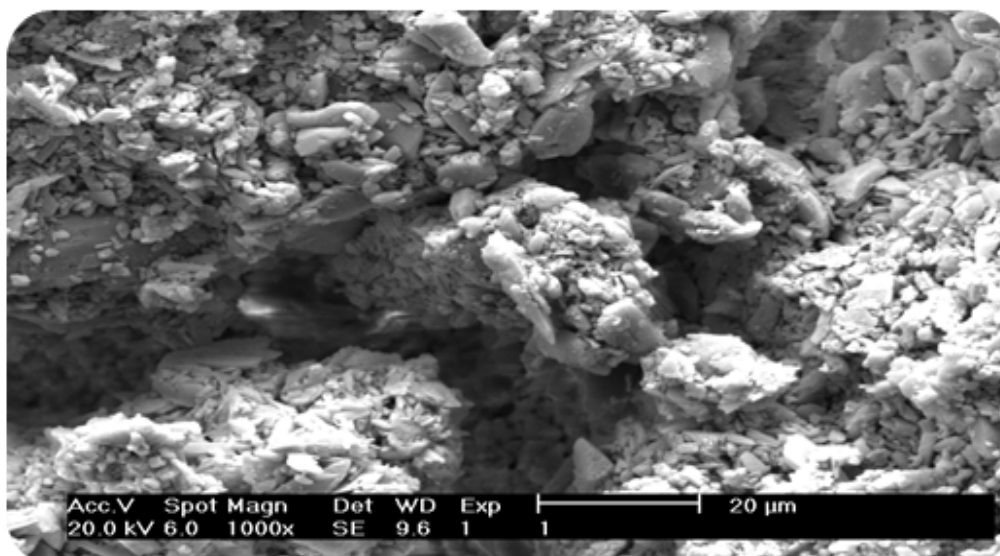


Figura 35. Morfologia referente aos biocimentos BC-00 formados por fragmentos de cristais de fosfato de cálcio.

Um estudo completo por micro-análise por EDX foi realizado sobre a superfície de fratura do biocimento BC-00, com o objetivo de verificar a composição química e o valor aproximado da razão molar Ca/P. O resultado em um ponto aleatório da amostra pode ser observado na figura 36, que mostra os picos característicos dos elementos cálcio e fósforo que formam o biocimento. Este tipo de análise permite quantificar a porcentagem de cada elemento que faz parte da composição do biocimento BC-00. Através da análise de EDX observaram-se, para a brushita formada, valores de 52,25% em peso para o cálcio, 47,75% em peso para o fósforo e uma razão estequiométrica Ca/P de 1,0.

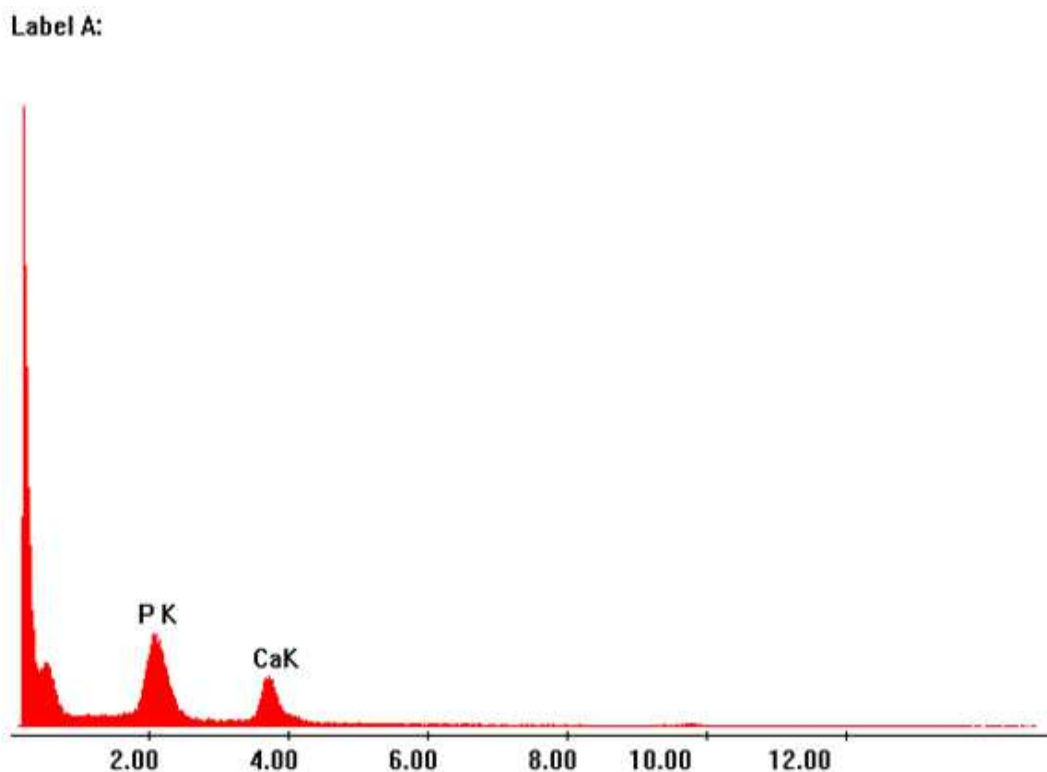


Figura 36. Análise qualitativa de elementos por espectroscopia de energia dispersiva da amostra BC-00.

A adição de sulfato de cálcio di-hidratado na amostra BC-10 (Figura 37) produziu mudanças na estrutura morfológica do biocimento. Observou-se uma redução significativa no tamanho dos cristais e, além das fases DCPD e β -TCP identificadas anteriormente, foi verificada a presença de cristais em forma de agulhas, característicos do CSD.

Segundo Mirtchi et al., (1989), a presença de sulfato de cálcio favorece a precipitação de fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD) na mesma forma (agulhas) em composições de cimento à base de β -fosfato tricálcio, aumentando a resistência mecânica das composições.

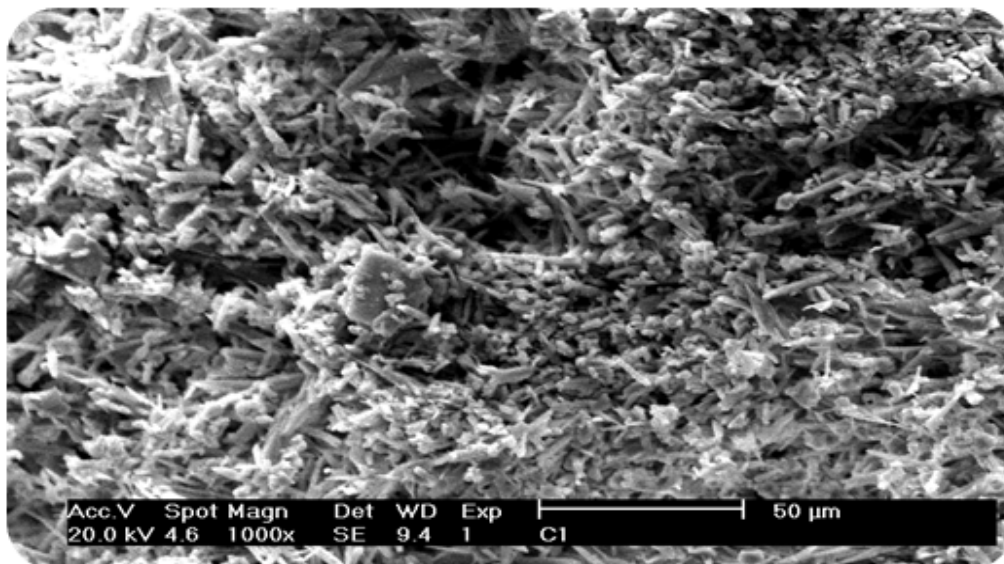


Figura 37. Morfologia referente aos biocimentos BC-10 formados por fragmentos de cristais de fosfato de cálcio.

A Figura 38 corresponde aos resultados da análise qualitativa de elementos por espectroscopia de raios X (EDX) de um ponto aleatório da superfície de fratura da amostra BC-10, mostrando os picos característicos dos elementos cálcio, fósforo e enxofre, indicando a composição do biocimento. Outros espectros foram obtidos durante a análise e todos apresentaram a mesma proporcionalidade destes elementos sem variação significativa entre as diferentes amostras.

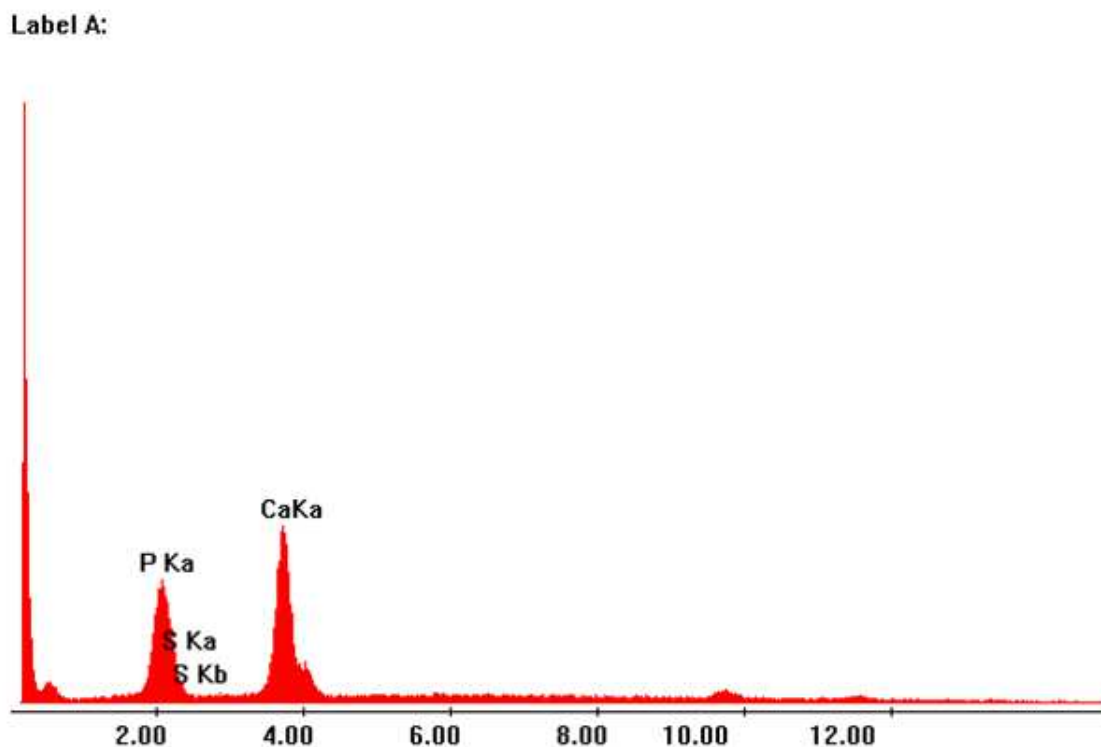


Figura 38. Análise qualitativa de elementos por espectroscopia de energia dispersiva da amostra BC-10.

O aumento da quantidade de sulfato de cálcio di-hidratado adicionado na amostra BC-30 produziu mudanças significativas na estrutura morfológica em comparação com o biocimento sem aditivo (Figura 39). As micrografias das amostras apresentam uma redução significativa da quantidade de agulhas de sulfato de cálcio di-hidratado e um aumento dos cristais em forma de placas, característico do DCPD e uma menor quantidade de partículas aglomeradas de β -TCP. Isto pode ser explicado pelo aumento da quantidade de líquido utilizado, proporcional à quantidade de sulfato de cálcio na composição, como mencionado nos resultados de difração de raios X.

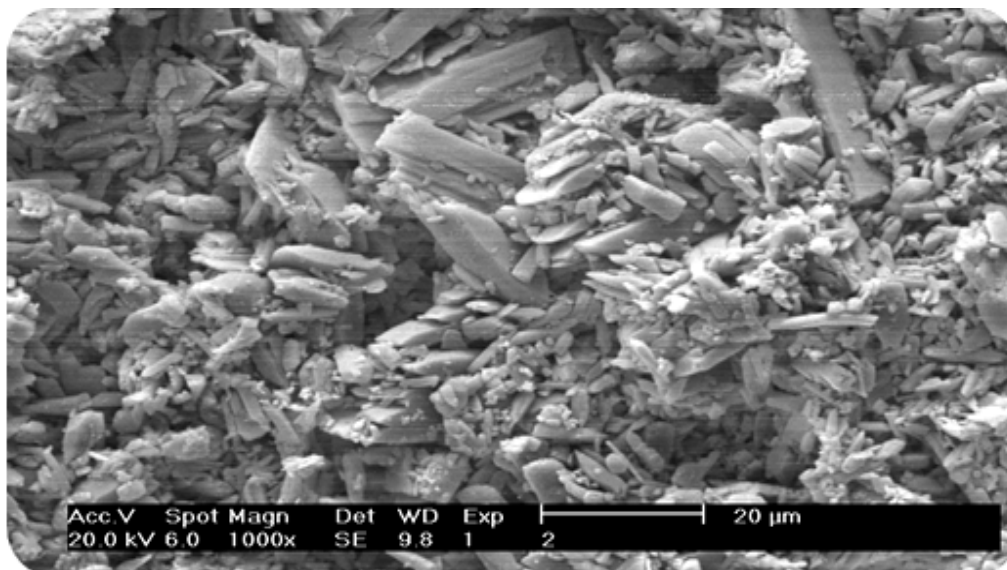


Figura 39. Morfologia referente aos biocimentos BC-30 formados por fragmentos de cristais de fosfato de cálcio.

A presença de sulfato de cálcio em excesso modificou significativamente a microestrutura das superfícies de fratura das amostras BC-50 quando comparadas com a superfície da amostra isenta de aditivo (Figura 40). Além da diminuição do tamanho dos cristais das fases presentes, já mencionada para a amostra BC-30, a Figura mostra a presença de aglomerados resultante da dissolução das fases cristalinas dos biocimentos, principalmente dos cristais em forma de agulhas que correspondem ao sulfato de cálcio di-hidratado. Estes são mais solúveis que a brushita (DCPD), diminuindo assim, o inter cruzamento dos cristais e aumentando a porosidade e conseqüentemente reduzindo a resistência mecânica (Carrodegua, 2000).

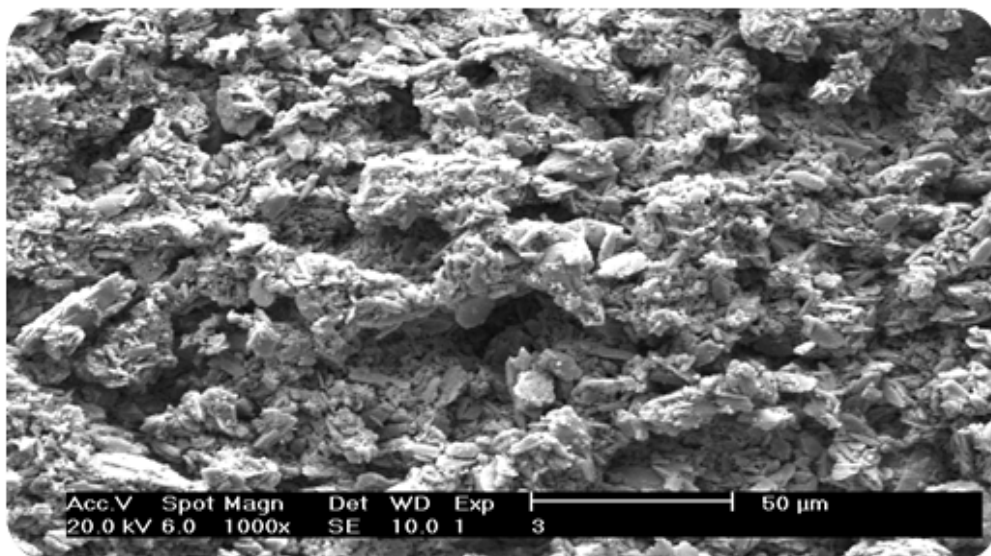


Figura 40. Morfologia referente aos biocimentos BC-50 formados por fragmentos de cristais de fosfato de cálcio.

4.3 Análise Estatística dos Biocimentos

O planejamento experimental foi realizado com objetivo de determinar os valores apropriados de tempo de pega, pH, resistência à compressão diametral e porosidade em função das propriedades químicas e mecânicas dos biocimentos.

Os resultados obtidos para os ensaios químicos e mecânico estão detalhados no Apêndice B. A Tabela 11 apresenta os valores médios e seus desvio padrão obtidos para estes ensaios. Os tratamentos obtidos correspondem aos teores de sulfato de cálcio di-hidratado adicionado.

Tabela 11. Tempo de cura, pH, compressão diametral e porosidade dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

CIMENTO	L/P	Tempo de Cura Inicial (min)	Tempo de Cura Final (min)	pH	Compressão Diametral (MPa)	Porosidade (%)
BC-00	0,8	6,3 \pm 0,4	22,0 \pm 3,6	7,23 \pm 0,1	0,59 \pm 0,1	52,5 \pm 2,8
BC-10	0,8	3,9 \pm 0,5	5,7 \pm 1,2	6,84 \pm 0,4	1,08	52,1 \pm 5,5
BC-30	0,8	3,5 \pm 0,1	5,0	6,35 \pm 0,2	1,51 \pm 0,1	49,7 \pm 1,7
BC-50	0,8	4,9 \pm 0,6	6,7 \pm 2,1	6,47 \pm 0,4	1,43 \pm 0,1	51,4 \pm 0,9

4.3.1 Tempos de Pega

A Tabela 12 apresenta a planilha de dados para os tempos de pega inicial e final, juntamente com a média aritmética e o desvio padrão dos biocimentos.

Tabela 12. Planilha de dados do tempo inicial e final de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Tratamentos (%)	Média t_i (min)	Desvio Padrão t_i (min)	Média t_f (min)	Desvio Padrão t_f (min)
0	5,66667	0,41633	19,36667	1,05987
10	3,96667	0,49329	5,73333	0,49329
30	3,5	0,1	5,36667	0,11547
50	4,93333	0,64291	5,96667	0,61101

De forma a analisar estes resultados, foram construídos, com base na Tabela 12, os gráficos apresentados nas Figuras 41 e 42.

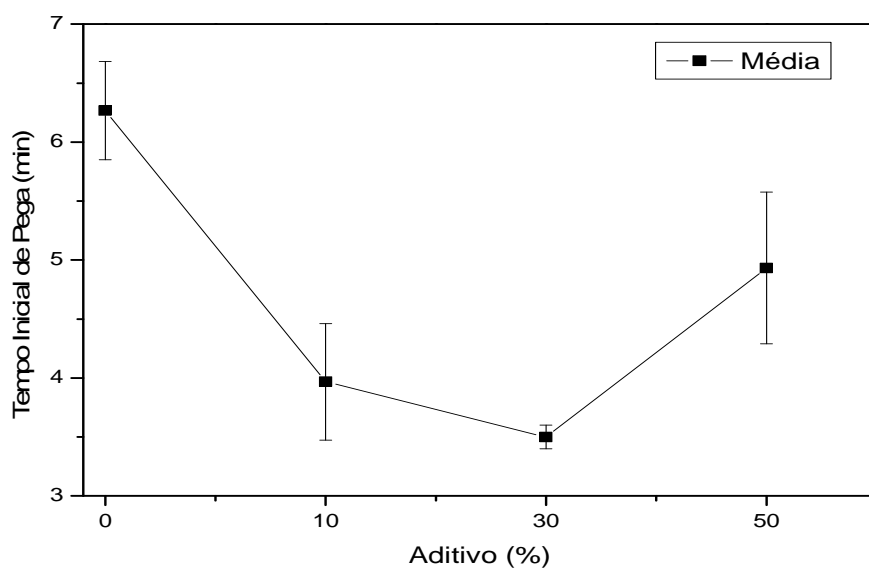


Figura 41. Tempo inicial de pega dos biocimentos (DCPD/β-TCP).

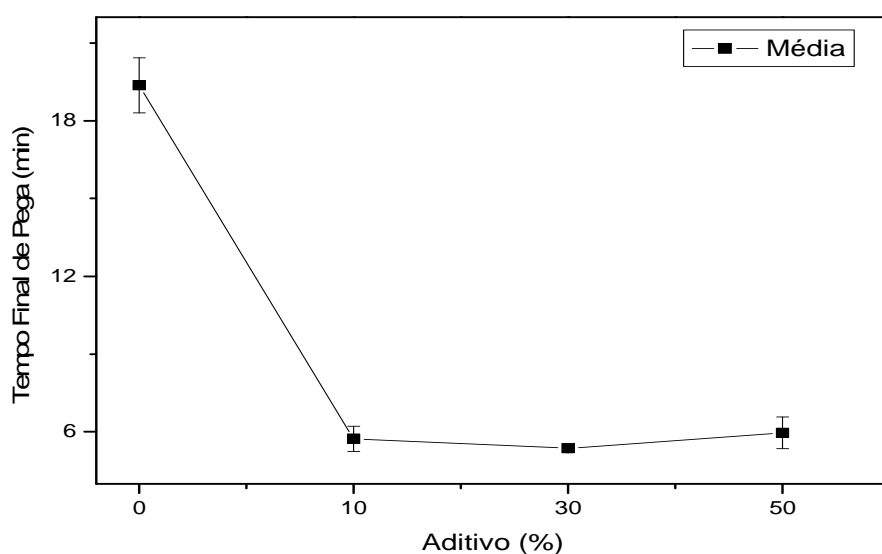


Figura 42. Tempo final de pega dos biocimentos (DCPD/β-TCP).

Conforme observado nas figuras 41 e 42, a conclusão imediata da análise destes resultados preliminares é que, nas condições empregadas, o tempo inicial e final de pega diminui com o aumento da quantidade de aditivo e que existe diferença nas médias aritméticas das amostras para os quatro

tratamentos.

Teste de ANOVA

A análise de variância (ANOVA de fator único) com nível de significância (α) de 5% foi utilizada com objetivo de verificar se a variação dos resultados das médias aritméticas dos tempos de pega inicial e final não são todos iguais, como mostram as tabelas 13 e 14. Para esta análise foi utilizado o programa Origin[®] 8. Os testes são realizados com estatística F.

Tabela 13. Análise de Variância do tempo inicial de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	<i>p</i> -valor
Aditivo	13,44667	3	4,48222	21,34392	3,57387E-4
Resíduo	1,68	8	0,21		
Total	15,12667	11			

Tabela 14. Análise de Variância do tempo final de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	<i>p</i> -valor
Aditivo	421,4825	3	140,494167	320,51901	1,136917E-8
Resíduo	3,506667	8	0,438333		
Total	424,989167	11			

A análise de variância permite comparar as médias aritméticas dos tratamentos com base no valor *p*-valor. A probabilidade de obter uma estatística F igual ou superior a 21,34392 para o tempo mínimo de pega e 320,51901 para

o tempo máximo de pega, quando a hipótese nula é verdadeira, corresponde a $3,57387E-4$ para o tempo inicial e $1,13692E-8$ para o tempo final de pega. Uma vez que esses p-valores é menor do que o nível de significância especificado ($\alpha = 5\%$) a hipótese nula foi rejeitada, ou seja, as médias não são estatisticamente iguais. Os valores-p de $3,57387E-4$ e $1,13692E-8$ indicam que só existe uma chance de 0,04% e 0,000001% de serem observadas diferença desses valores se as médias aritméticas dos quatro tratamentos forem iguais.

Teste de Tukey- Kramer

Depois de realizado o teste análise de variância e ter encontrado uma diferença significativa entre os tempos de pega foi executado o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer para determinar quais dentre as médias aritméticas são significativamente diferentes (tabelas 15 e 16).

Tabela 15. Teste de Tukey-Kramer correspondente ao tempo inicial de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Comparação Tratamentos	Diferença Absoluta	Erro-Padrão da Diferença	Intervalo Crítico
0 - 10	2,3	0,37417	1,19821
0 - 30	2,76667	0,37417	1,19821
0 - 50	1,33333	0,37417	1,19821
10 - 30	0,46667	0,37417	1,19821
10 - 50	0,96667	0,37417	1,19821
30 - 50	1,43333	0,37417	1,19821

Tabela 16. Teste de Tukey-Kramer correspondente ao tempo final de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Comparação Tratamentos	Diferença Absoluta	Erro-Padrão da Diferença	Intervalo Crítico
0 - 10	13,63333	0,54057	1,73111
0 - 30	14	0,54057	1,73111
0 - 50	13,4	0,54057	1,73111
10 - 30	0,366667	0,54057	1,73111
10 - 50	0,233333	0,54057	1,73111
30 - 50	0,6	0,54057	1,73111

O teste de Tukey avalia a igualdade entre os tratamentos, então é um teste de hipóteses. Nestes resultados vemos que a hipótese de igualdade é rejeitada para tempo inicial de pega entre os níveis: 0 - 10, 0 - 30, 0 - 50, 30 - 50 e para tempo final entre os níveis 0 - 10, 0 - 30 e 0 - 50. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas, ou seja, apresentam aproximadamente o mesmo valor de tempo inicial e de tempo final de pega.

Sabe-se que o tamanho médio das partículas do cimento pode influenciar a quantidade de líquido necessário para a obtenção do material com consistência de pasta (Toniolo, 2004). Em geral, a nucleação e crescimento de um cristal que ocorrem durante o processo de pega do biocimento são derivados do grau de supersaturação, que depende da taxa de dissolução dos fosfatos de cálcio. A taxa de dissolução dos fosfatos de cálcio é controlada pela solubilidade e pela área superficial do sólido. Assim, pode-se estimar que quanto menores as partículas do cimento, mais rapidamente a mistura irá endurecer, ou seja, o tempo de pega é dependente dos processos de síntese e beneficiamento da matéria-prima.

Para comparar o grau de retardo desencadeado com o aumento do teor do aditivo incorporado, realizou-se a avaliação do tempo de pega apenas em caráter qualitativo. A avaliação foi empírica, sendo realizada através da

verificação se a pega do biocimento estabeleceu-se num período de tempo superior ou inferior ao relatado na literatura. Considerou-se como o tempo de cura final aquele em que o tronco cônico do aparelho de *Vicat* deixou somente marcas ligeiramente perceptíveis na superfície da amostra.

Constatou-se empiricamente que a amostra BC-00 (sem a incorporação de aditivo) apresentou um tempo de pega inicial de 5 minutos. Através desta mesma avaliação constatou-se que todas as formulações com incorporação de aditivos atingiram tempos de pega inicial inferiores a 5 minutos, ficando em primeira instância, fora dos padrões para aplicações clínicas.

Através da comparação dos tempos de cura das diferentes formulações propostas constatou-se que todos apresentaram uma tendência de diminuição do tempo de cura com a incorporação de aditivo. Como mencionado anteriormente, o tempo de cura é um parâmetro fundamental para a utilização biomédica do material a ser desenvolvido. Neste contexto, o tempo de cura deve ser pequeno, mas não tão pequeno que impeça o processo de colocação do cimento no local desejado. Segundo Driessens e colaboradores (1997), o tempo de pega inicial para a formulação de cimento a base de fosfato tricálcico é de cerca de 5 minutos. Levando-se em consideração o tempo de mistura, homogeneização e injeção no local destinado. Após a realização destes processos deseja-se um tempo de pega o menor possível para impedir que o cimento migre para locais não desejados, para fora do local de injeção. Assim, o tempo de cura não pode ser tão rápido que impeça ou dificulte qualquer um dos processos de mistura, homogeneização ou injeção. Esses autores não especificam o método de ensaio empregado, mas a descrição da metodologia mostra que eles utilizam o método de *Gillmore*. Com isto, podemos supor que este seja o método para o qual se estabelece o limite mínimo de 5 minutos para o tempo de cura inicial. Levando em conta que neste trabalho o método utilizado foi o de *Vicat* adaptado, não se podem descartar os resultados obtidos para as formulações BC-10, BC-30 e BC-50 com tempo inicial de cura inferior a 5 minutos.

4.3.2 pH

A Tabela 17 apresenta a planilha de dados para o pH de quatro tratamentos, juntamente com a média aritmética e o desvio padrão.

Tabela 17. Planilha de dados do pH dos tratamentos.

Tratamentos (%)	Média	Desvio Padrão
0	7,23333	0,05774
10	6,83333	0,35119
30	6,33333	0,15275
50	6,46667	0,35119

A Figura 43 mostra, graficamente, os resultados obtidos para o pH das amostras após 24 horas de imersão em água destilada a uma temperatura de 37°C.

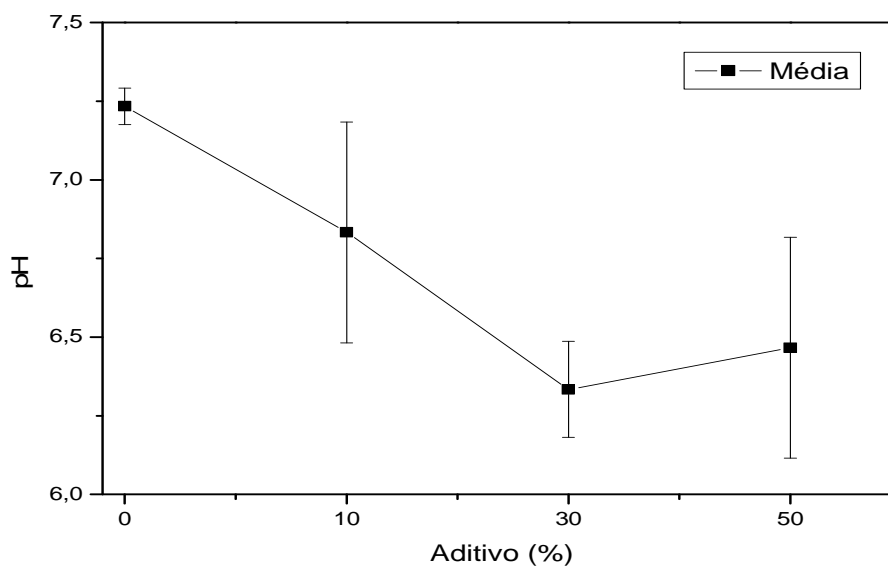


Figura 43. Ensaio de pH dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

A partir dos resultados preliminares, pode-se verificar uma variação significativa do pH dos biocimento de fosfato tricálcico em função do aditivo adicionado e que existe diferença nas médias aritméticas para as quatro formulações. Pode-se verificar também que a grande maioria das formulações apresentou valores encontrados na faixa de pH concentrados entre 6.5 a 6.9, variando de acordo com a quantidade de aditivo incorporado. Isto é importante pelo fato que materiais com pH na faixa entre 6,5 a 8 são considerados adequados para implantação (Driessens et al., 1997).

Teste de ANOVA

A análise de variância (ANOVA de fator único) com nível de significância (α) de 5% foi utilizada com objetivo de verificar estatisticamente se a variação dos resultados é suficientemente diferente para que se conclua que as médias aritméticas dos pH não são todas iguais. Para esta análise foi utilizado o programa Origin[®] 8. Os testes são realizados com estatística F.

A tabela ANOVA utilizada para avaliar a significância do efeito das variáveis pH está apresentada na tabela 18.

Tabela 18. Análise de variância do pH dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	<i>p</i> -valor
Aditivo	1,47	3	0,49	7,17073	0,01175
Resíduo	0,35119	8	0,06833		
Total	2,01667	11			

A partir da tabela 18 tem-se que o *p*-valor é consideravelmente menor que $\alpha = 5\%$, o que indica a rejeição de H_0 , ou seja, existe evidência suficiente de uma diferença na média aritmética do pH para os quatro níveis.

Teste Tukey-Kramer

Utilizando o procedimento de múltiplas comparações foram determinadas quais dentre as médias aritméticas são consideradas significativamente diferentes.

Os resultados estão apresentados na tabela 19.

Tabela 19. Teste de Tukey-Kramer correspondente ao pH dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Comparação Níveis	Diferença Absoluta	Erro-Padrão da Diferença	Intervalo Crítico
0 - 10	0,4	0,21344	0,6835
0 - 30	0,9	0,21344	0,6835
0 - 50	0,76667	0,21344	0,6835
10 - 30	0,5	0,21344	0,6835
10 - 50	0,36667	0,21344	0,6835
30 - 50	0,13333	0,21344	0,6835

O procedimento indica que existe diferença significativa entre os pares de médias: 0 – 30 e 0 – 50, exceto entre os pares: 0 – 10, 10 – 30, 10 – 50 e 30 – 50, ou seja, os biocimentos sem aditivo e com 10% de aditivo, com 10% e 30% de aditivo, com 10% e 50% de aditivo e com 30% e 50 % de aditivo apresentam aproximadamente o mesmo pH, enquanto os outros níveis testados de concentração produzem pH diferentes.

Para todas as formulações com incorporação de sulfato de cálcio di-hidratado, observou-se a diminuição gradual do pH, sendo menor para a formulação BC-50, que apresentou um valor de pH $6,47 \pm 0,4$. Acredita-se que os baixos valores de pH tenham favorecido a precipitação da fase brushita, caracterizada pela redução do tempo de cura proveniente do inter cruzamento dos cristais recém formados (Ratner, 1996).

Segundo Fernández e colaboradores (1999) o pH do cimento é o principal fator controlador das concentrações de Ca e P na solução de cimento, afetando as taxas da reação de pega. Os principais parâmetros que afetam a variação de pH durante a pega do cimento incluem: a composição química dos principais componentes do cimento, a proporção dos reagentes na mistura, o tamanho relativo de partículas dos componentes principais do cimento, o tamanho de partículas do material usado como semente de cristalização, o uso de aceleradores ou retardadores na fase líquida e sua concentração relativa, a razão líquido/pó e a temperatura.

4.3.3 Resistência à Compressão Diametral

As principais medidas dos ensaios mecânicos estão relacionadas na Tabela 20. Os dados referem-se à resistência ao teste de compressão diametral (MPa) para cada um dos quatro tratamentos estudados.

Tabela 20. Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral dos quatro tratamentos.

Tratamentos (%)	Resistência Média	Desvio Padrão
0	0,59333	0,05033
10	1,08333	0,03512
30	1,50667	0,06506
50	1,43	0,09165

O gráfico da Figura 44 apresenta a resistência à compressão diametral das diferentes formulações, com relação à fração dos aditivos incorporados nos tratamentos. Pode-se observar que um aumento no teor de aditivo na massa gera um inicial aumento da resistência, até que seja atingido um limite (cerca

de 30%), quando começa a decair.

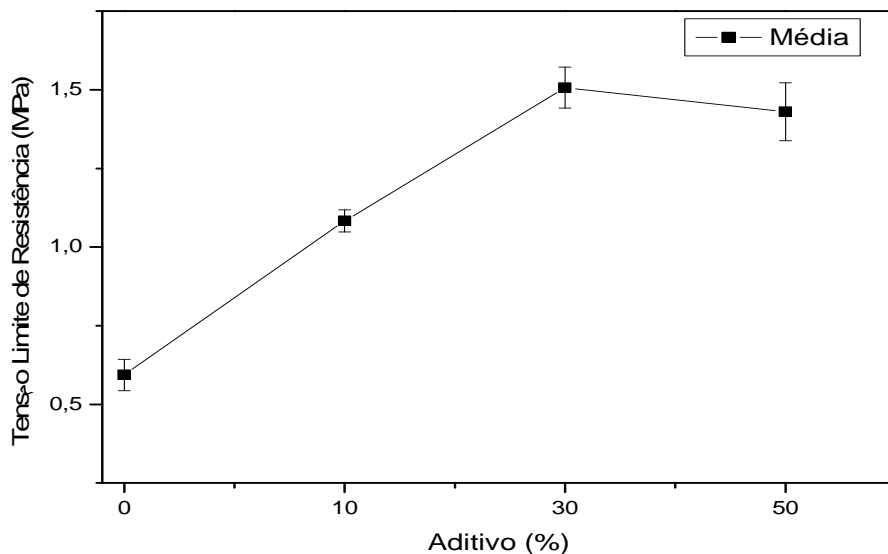


Figura 44. Ensaio de resistência à compressão diametral dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Teste de ANOVA

Os resultados referentes aos testes de tração diametral descrito na tabela 21 foram submetidos a análise de variância (ANOVA de fator único) com nível de significância (α) de 5%, com o propósito de averiguar estatisticamente se a variação dos resultados é suficientemente diferente para que se conclua que as médias aritméticas das resistências não são todas iguais, como mostra a tabela 21. Para esta análise foi utilizado o programa Origin[®] 8. Os testes foram realizados com estatística F.

Tabela 21. Análise de variância da resistência à tração por compressão diametral dos quatro níveis.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Aditivo	1,55967	3	0,51989	126,80217	4,39244E-7
Resíduo	0,0328	8	0,0041		
Total	1,59247	11			

Ao realizar a ANOVA foi observado que o aditivo empregado influencia de maneira significativa as propriedades mecânicas dos biocimentos para um nível de confiança de 0,05. Neste caso, como o p-valor é menor do que o α especificado de 0,05 rejeitamos a hipótese nula de igualdade das médias, ou seja, podemos dizer que existe diferença estatisticamente significativa na média aritmética das resistências à compressão diametral dos biocimentos no que concerne às quatro formulações.

Teste de Tukey-Kramer

Como o teste ANOVA demonstrou haver diferenças entre os níveis, o método de comparações múltiplas de Tukey foi empregado para determinar quais níveis apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 22. Teste de Tukey-Kramer correspondente a resistência à compressão diametral dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Comparação Níveis	Diferença Absoluta	Erro-Padrão da Diferença	Intervalo Crítico
0 - 10	0,49	0,05228	0,16742
0 - 30	0,91333	0,05228	0,16742
0 - 50	0,83667	0,05228	0,16742
10 - 30	0,42333	0,05228	0,16742
10 - 50	0,34667	0,05228	0,16742
30 - 50	0,07667	0,05228	0,16742

Desta análise, vemos que existem diferenças significativas entre todos os pares de média, exceto entre 30 – 50. Isso implica que 30 e 50 % de concentração de sulfato de cálcio produzem aproximadamente, a mesma resistência á compressão diametral e que todos os outros níveis testados de concentração produzem resistências diferentes, ou seja, é possível concluir, com 95% de confiança, que a formulação BC-00 apresenta menor resistência á compressão diametral do que as formulações BC-10, BC-30 e BC-50 e a formulação BC-10 apresenta menor resistência do que as formulações BC-30 e BC-50.

Segundo Santos (2000), uma possível explicação para o aumento da resistência à compressão diametral das formulações seria a transferência das tensões aplicadas ao compósito biocimento/sulfato de cálcio, uma vez que a morfologia do sulfato de cálcio é de agulhas, o que permitiria um maior consumo de energia durante o processo de propagação de trincas, devido à energia consumida para separar as agulhas de sulfato de cálcio da matriz de biocimento. Evidentemente, esse processo deve ocorrer mais eficazmente quanto maior for a adesão das agulhas de sulfato de cálcio à matriz de cimento.

A redução da resistência à compressão da formulação com 50% de

sulfato de cálcio pode ser explicada devido ao aumento de porosidade, associada à maior quantidade de líquido na preparação. Este resultado é ratificado pelo modelo matemático proposto por Knudsen (Santana, 2010), segundo o qual a resistência mecânica dos materiais cerâmicos diminui exponencialmente com a elevação do nível de porosidade. A presença de poros em maior quantidade e com diferentes morfologias favorece o surgimento de defeitos em sua vizinhança como, por exemplo, microtrincas. Incorporadas durante o processamento, as microtrincas agem como concentradores de tensões e, ao serem submetidas a esforços mecânicos, se propagam até atingirem um tamanho crítico, quando então, ocasionam a fratura da amostra. A Figura 45 apresenta fotografia de fratura das formulações ensaiadas.



Figura 45. Fotografia de fraturas apresentadas pelas amostras de biocimento submetidas ao ensaio de compressão diametral (50X).

4.4.4 Porosidade

A Tabela 23 apresenta a planilha de dados para a porosidade de quatro tratamentos de aditivos, juntamente com a média aritmética e o desvio padrão.

Tabela 23. Planilha de dados da porosidade aparente dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Aditivo (%)	Porosidade Aparente	Desvio Padrão
0	52,22667	2,87836
10	52,12	5,51293
30	49,74667	1,74386
50	51,25667	1,05548

A Figura 46 mostra graficamente os resultados obtidos para a porosidade das diferentes formulações, com relação à fração dos aditivos incorporados na matriz de biocimento. Observa-se que a porosidade diminui com o aumento da concentração de sulfato de cálcio e que ocorre um aumento na porosidade acima de 30%, caracterizando uma interferência do sulfato de cálcio na estrutura.

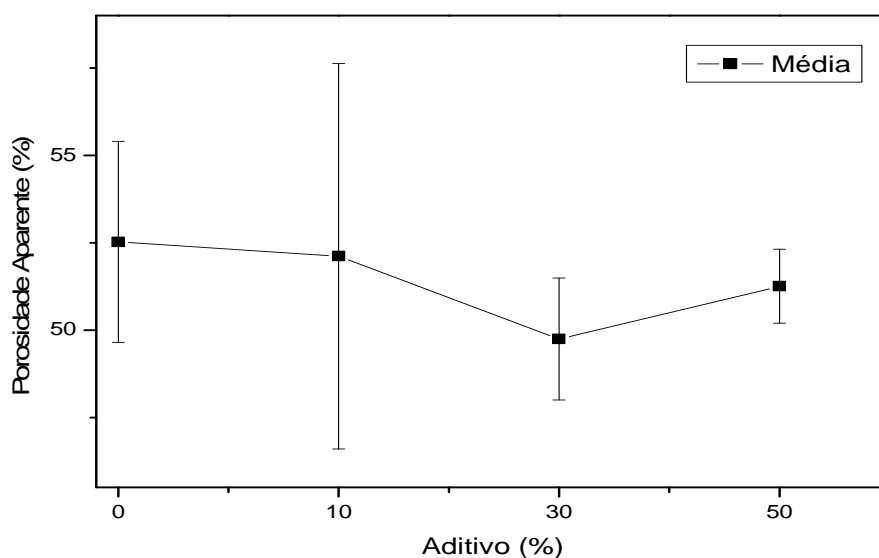


Figura 46. Ensaio de porosidade aparente dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Teste de ANOVA

A análise de variância (ANOVA de fator único) com nível de significância (α) de 5% foi utilizada com objetivo de conferir estatisticamente se a variação dos resultados é suficientemente diferente para que se conclua que as médias aritméticas das porosidades aparentes não são todas iguais. Para esta análise foi utilizado o programa Origin[®] 8. Os testes foram realizados com estatística F.

A Tabela 24 apresenta o resultado da análise estatística da porosidade aparente dos biocimentos.

Tabela 24. Análise de variância da porosidade aparente dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Aditivo	13,62363	3	4,54121	0,42409	0,74104
Resíduo	85,6648	8	10,7081		
Total	99,28843	11			

Através da ANOVA realizado pelo programa computacional Origin[®] 8, podemos concluir que sendo o p-valor igual a 0,704104, não rejeitamos a hipótese nula de igualdade de médias para nível de significância $\alpha = 0,05$. Assim, esses resultados permitem concluir que para o nível de significância especificado, a média aritmética das porosidades aparente dos biocimentos são todas iguais. Com base nestes resultados não foi preciso utilizar o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

A porosidade aparente obtida para todas as amostras encontra-se em níveis elevados, entre 30 a 53 %, sem alterações significativas entre as diferentes formulações propostas. Com exceção das formulações C-50 que apresentaram porosidade mais elevada (acima de 60%), provavelmente devido ao elevado teor de sulfato de cálcio (ponto de saturação).

Nos materiais biocerâmicos frágeis, os poros constituem regiões onde a tensão se concentra, e quando a tensão junto ao poro atinge um valor crítico, forma-se uma fenda que se propaga, visto que nestes materiais não existem processos suficientemente absorvedores de energia como aqueles que operam durante a deformação de materiais dúcteis. Os poros são também prejudiciais para a resistência dos materiais cerâmicos porque fazem diminuir a área da seção transversal em que é aplicada a carga e conseqüentemente fazem baixar a tensão que o material pode suportar (Smith, 1998). Deste modo, o tamanho e a distribuição do tamanho de poros são fatores importantes que afetam sua resistência.

Como a porosidade é considerada um fator favorável à osteocondução, permitindo o crescimento de osso no interior dos poros, pode-se dizer que todas as formulações apresentam tendência de favorecerem este comportamento biológico tendo em vista que todas as formulações apresentaram porosidade aparente superior a 30%, conforme figura 46. No entanto, sabe-se que a resistência mecânica é inversamente proporcional à porosidade do corpo cerâmico, visto que é uma propriedade dependente da porção sólida do material, ou seja, os vazios teoricamente tendem a influenciar negativamente na resistência mecânica.

4.5 Estudo da Liberação de Ampicilina nos Biocimentos BCF-00 e BCF-10

A ampicilina foi o fármaco escolhido neste trabalho em virtude de sua conhecida utilização no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas suscetíveis (por exemplo, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp.). A Ampicilina também é usada para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas suscetíveis (por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, estafilocócitos não produtores de penicilinas, *Clostridium* sp, *Bacillus anthracis*, *Corinebacterium xerose*, *Listeria* e grande parte dos

enterococos (Ferreira, 2004).

Seu emprego na forma oral pode causar efeitos colaterais tais como diarreia, náusea, depressão, cansaço, colite isquêmica, trombose entre outros. Assim, no caso de hipertensão, por exemplo, o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada de antihipertensivos é vantajoso por minimizar esse tipo de desconforto para o paciente, visto que a concentração da droga tende a se manter num nível controlável na corrente sanguínea por um período de tempo maior.

Os padrões de difração de raios X dos biocimentos incorporados com ampicilina apresentaram perfil semelhante ao obtido para a amostra BC-10. Isto era de se esperar, pois a ampicilina não apresenta difratograma característicos por não ser uma amostra cristalina.

Com o objetivo de investigar a influência das características estruturais das matrizes na liberação da ampicilina, as amostras BCF-00 e BCF-10 foram testadas.

O perfil de liberação do fármaco a partir da amostra BCF-10 foi estudado em função do tempo e comparado com a liberação de fármaco da amostra BCF-00, como apresentado na Figura 47. Pode-se observar que a amostra BCF-00 libera maior quantidade de fármaco por unidade de tempo quando comparado com a amostra BCF-10. Sendo assim, a associação de sulfato de cálcio di-hidratado modifica o perfil de liberação do fármaco incorporado na amostra. Ao longo do tempo, esses sistemas apresentam comportamento análogo, mas com taxas de liberação distintas.

Segundo Ogawa e Plepis (2002), outros fatores afetam a liberação de fármacos de biomateriais, tais como a porosidade da matriz utilizada e a quantidade de droga incorporada. A porosidade da matriz, neste caso, está formada pela porosidade inicial intrínseca do material e aquela formada pela dissolução do antibiótico.

Comparando os perfis de liberação, os resultados indicam que em 24 horas de experimento, 11,53% do fármaco são liberados da amostra BCF-10, enquanto a mostra BCF-00 libera 13,00%. Essa liberação inicial é atribuída à

dissolução e liberação imediata da porção do fármaco localizada na superfície dos cilindros. Pode-se perceber uma diferença nos dois sistemas com relação à quantidade de fármaco inicialmente liberada, a qual é maior para a amostra BC-00. Este decréscimo na taxa de liberação provavelmente ocorre em função da quantidade de poros presentes nas amostras. Este fato sugere a existência de alguma interação de natureza desconhecida entre o aditivo (CSD) e o fármaco. No caso da amostra BCF-10, o processo de síntese levou à incorporação de sulfato de cálcio di-hidratado, provocando assim, uma diminuição em sua porosidade aparente e por simples questões geométricas, uma maior dificuldade de difusão do fármaco ao longo dos poucos espaços vazios disponíveis na estrutura.

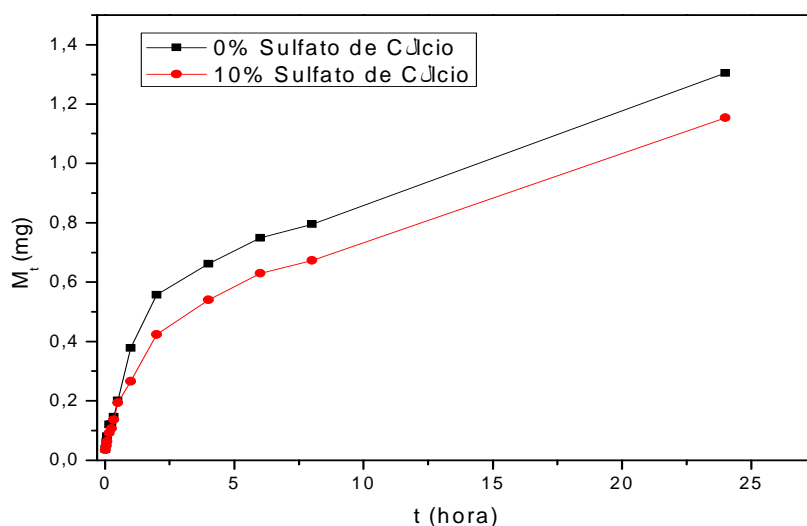


Figura 47. Perfil de liberação de ampicilina nos biocimentos BCF- 00 e BCF-10.

A Figura 48 apresenta a taxa de liberação de ampicilina das amostras BCF-00 e BCF-10, com 1% de antibiótico.

Verificou-se que as amostras apresentam taxa de liberação decrescente com o tempo, como era de se esperar, visto que a quantidade de droga liberada vai diminuindo com tempo. Esta rápida taxa de liberação pode ser

vantajosa, visto que garantiria alta concentração de antibiótico no início de uma infecção.

A natureza das curvas mostradas na Figura 47 sugere que nenhuma das matrizes tem liberação com taxa de liberação de ordem zero. Observa-se que a liberação é rápida nas primeiras horas do experimento, seguida de uma liberação bem mais lenta, atingindo o equilíbrio após 5 horas, como pode ser observado na Figura 48.

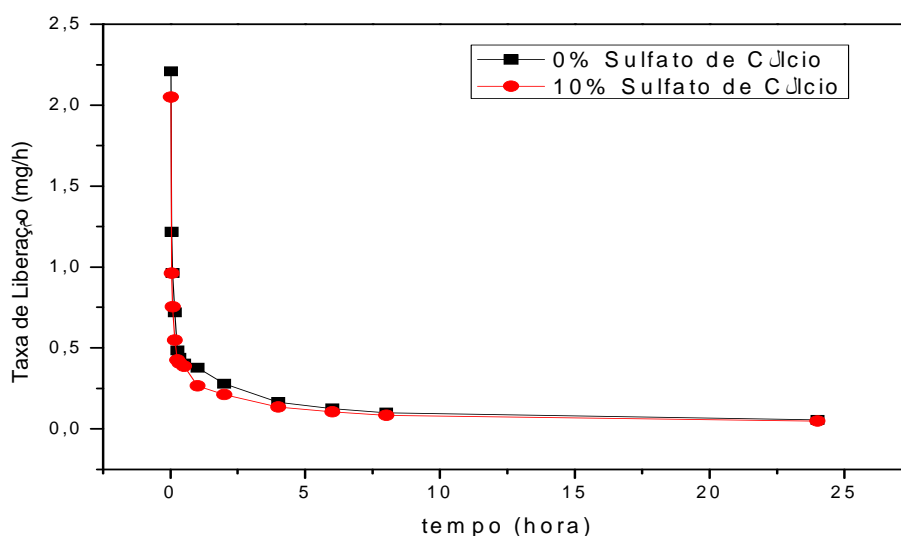


Figura 48. Taxa de liberação de ampicilina das amostras BCF-00 e BCF-10.

A liberação muito lenta de drogas pode não ser muito vantajosa, visto que poderia não surtir o efeito terapêutico desejado e até mesmo provocar resistência da bactéria ao antibiótico (Ogawa e Plepis, 2002).

Para investigar mais precisamente o efeito da estrutura devido às formulações, os resultados foram analisados de acordo com o modelo de Higuchi. Em seguida, foi determinado o valor do coeficiente de liberação (n), utilizando a equação de Korsmeyer – Peppas (Costa, et. al., 2001).

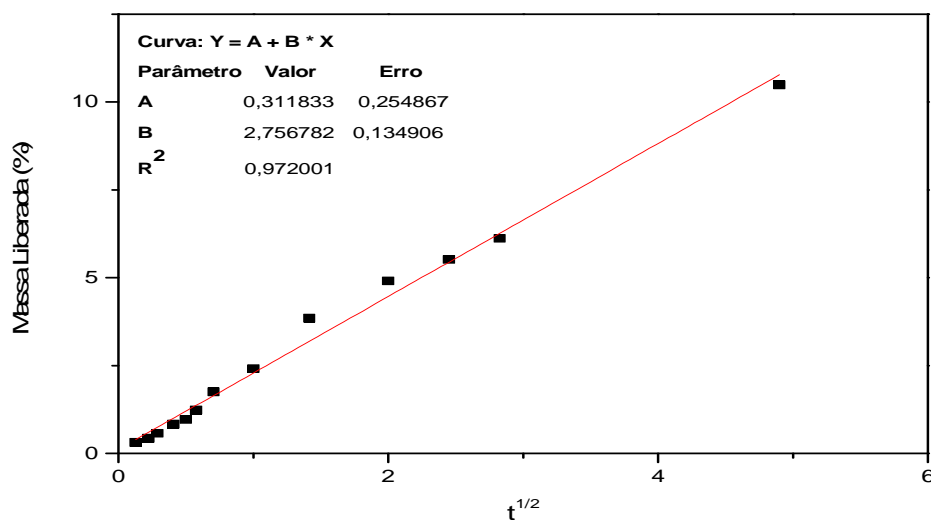


Figura 49. Modelo de Higuchi para as 24 horas de liberação de ampicilina da amostra BCF-00.

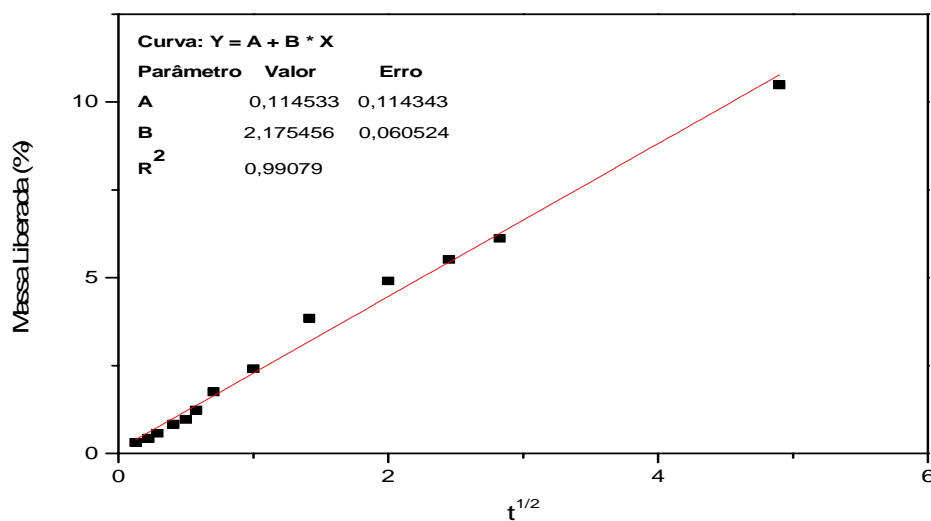


Figura 50. Modelo de Higuchi para as 24 horas de liberação de ampicilina da amostra BCF-10.

As Figuras 49 e 50 mostram a cinética de liberação de ampicilina das amostras BCF-00 e BCF-10. Verifica-se, para ambos os experimentos, que a quantidade de ampicilina liberada em função da raiz quadrada do tempo

obedece ao modelo de Higuchi. Embora um pequeno desvio da linearidade tenha sido observado, a análise mostra uma boa correlação entre os dados, indicando que a liberação de antibiótico é controlada por um mecanismo de difusão nos poros. Isto sugere que a liberação depende da porosidade das amostras. Deve-se salientar que a porosidade de um material destinado a enxerto ósseo é importante porque permite o desenvolvimento de osso e tecidos moles dentro dos poros, além de suprimento de sangue para posterior mineralização do osso (Ogawa e Plepis, 2002).

Analisando os sistemas através das Figuras 51 e 52, pode-se observar os valores de n obtidos para as duas formulações.

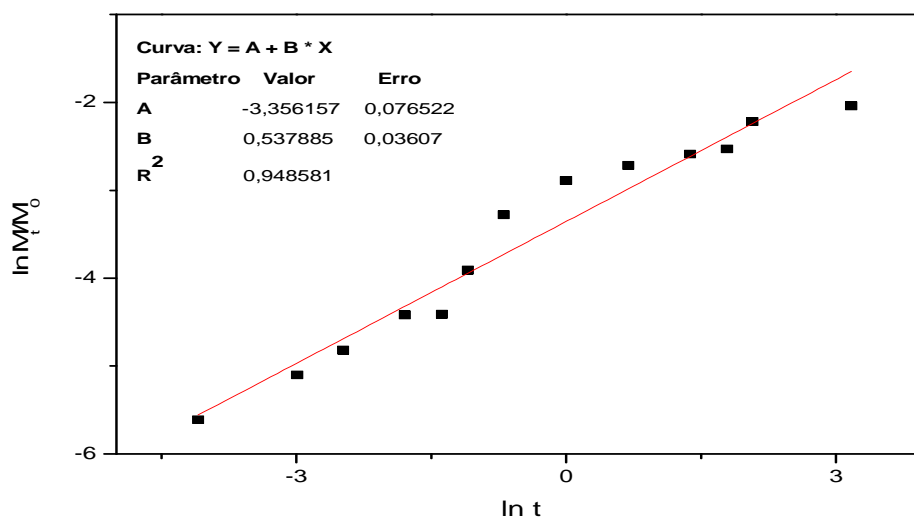


Figura 51. Modelo de Korsmeyer - Peppas para as 24 horas de liberação de ampicilina da amostra BCF-00.

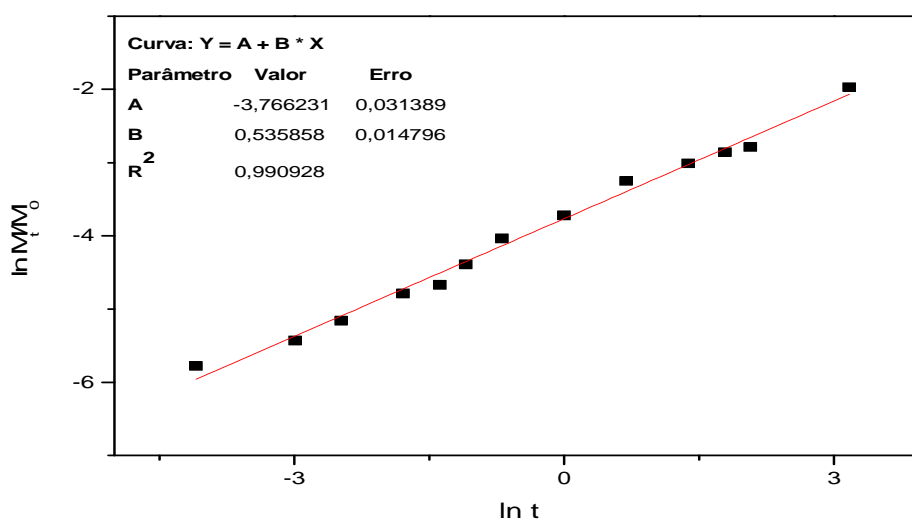


Figura 52. Modelo de Korsmeyer - Peppas para as 24 horas de liberação de ampicilina da amostra BCF-10.

De acordo com o modelo de Korsmeyer – Peppas, uma reta foi obtida pelos gráficos de liberação de ampicilina. O resultado da regressão linear mostra um valor de expoente de liberação n igual a 0,5 para as duas formulações. O resultado do valor de n mostra que a ampicilina é liberada devido a transporte governado por difusão de Fick.

4.5.1 Análise Estatística dos Biocimentos Incorporados com Fármacos

O planejamento experimental foi realizado com objetivo de determinar os valores apropriados do tempo de pega e resistência à compressão diametral em função das propriedades químicas e mecânicas dos biocimentos. Os tratamentos obtidos correspondem ao teor de ampicilina adicionada e estão detalhados no Apêndice C. A Tabela 25 apresenta os valores médios e seus desvios padrão, obtidos para estes ensaios.

Tabela 25. Tempo de pega e resistência à compressão diametral dos biocimentos incorporados com fármaco.

CIMENTO	L/P	Tempo de Cura (t_i)	Tempo de Cura (t_f)	Compressão Diametral (MPa)
BCF-00	0,8	5,2±1,0	11,8±4,3	0,63±0,1
BCF-10	0,8	3,8±0,8	9,1±1,0	0,73±0,1
BCF-30	0,8	3,4±1,2	8,6±2,7	0,98±0,0
BCF-50	0,8	3,4±0,2	10,2±4,1	1,11±0,2

4.5.1.1 Tempos de Pega

A Tabela 26 apresenta a planilha de dados para os tempos de pega inicial e final, juntamente com a média aritmética e o desvio padrão dos biocimentos incorporados com fármaco.

Tabela 26. Planilha de dados do tempo inicial e final de pega dos biocimentos incorporados com fármaco.

Tratamentos (%)	Média t_i	Desvio Padrão t_i	Média t_f	Desvio Padrão t_f
0	5,233333	1,001665	11,8	4,275512
10	3,8	0,781025	9,066667	0,981495
30	3,433333	1,150362	8,566667	2,67644
50	3,433333	0,208167	10,166667	4,062429

De forma a analisar estes resultados foram construídos, com base na tabela 12, os gráficos apresentados nas Figuras 53 e 54.

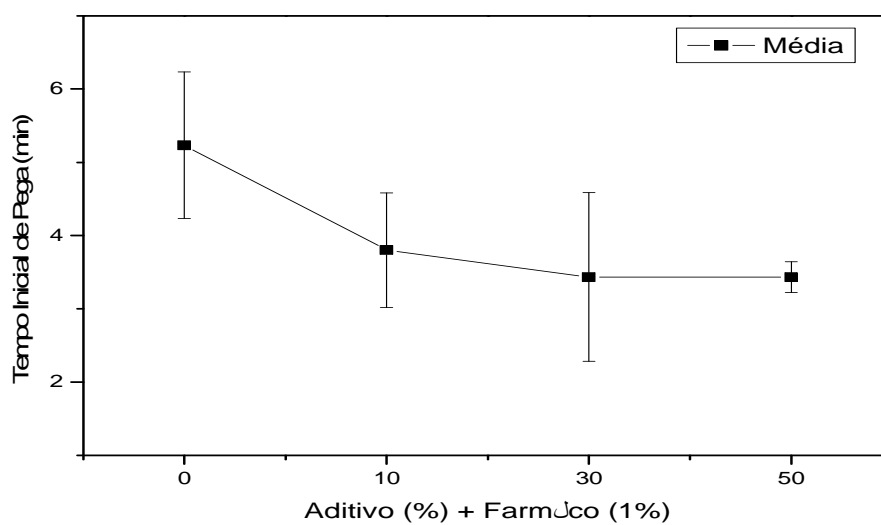


Figura 53. Tempo inicial de pega dos biocimentos incorporados com fármacos.

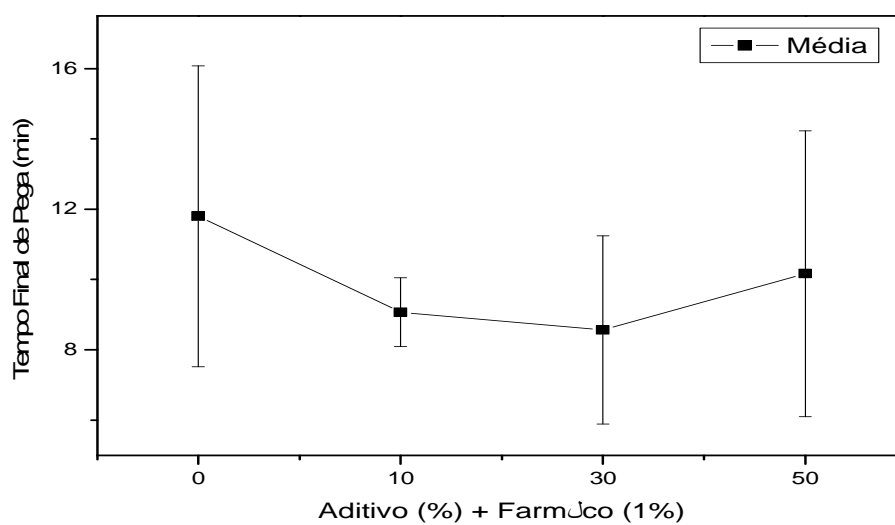


Figura 54. Tempo final de pega dos biocimentos incorporados com fármacos.

Teste de ANOVA

A análise de variância (ANOVA de fator único) com nível de significância

(α) de 5% foi utilizada com objetivo de verificar se a variação dos resultados das médias aritméticas dos tempos de pega inicial e final dos biocimentos incorporados com fármaco não são todos iguais, como mostram as Tabelas 27 e 28. Para esta análise foi utilizado o programa Origin[®] 8. Os testes foram realizados com estatística F.

Tabela 27. Análise de Variância do tempo inicial de pega dos biocimentos incorporados com fármaco.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p -valor
Aditivo	6,6025	3	2,200833	2,954139	0,098024
Resíduo	5,96	8	0,745		
Total	12,5625	11			

Tabela 28. Análise de Variância do tempo final de pega dos biocimentos incorporados com fármaco.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p -valor
Aditivo	18,46	3	6,153333	0,573604	0,648175
Resíduo	85,82	8	10,7275		
Total	104,28	11			

Através da ANOVA realizado pelo programa computacional Origin[®] 8, podemos concluir que sendo o p -valor igual a 0,098024 para o tempo inicial de pega e 0,648175 para o tempo final de pega, não rejeitamos a hipótese nula de igualdade de médias para nível de significância $\alpha = 0,05$. Assim, esses resultados permitem concluir que para o nível de significância especificado, a média aritmética dos tempos de pega inicial e final dos biocimentos incorporados com fármaco são todas iguais. Com base nestes resultados não

foi preciso utilizar o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

4.5.1.2 Resistência à Compressão Diametral dos Biocimentos Incorporados com Fármaco

As principais medidas dos ensaios mecânicos estão relacionadas na Tabela 29. Os dados referem-se à resistência ao teste de compressão diametral (MPa) para cada um dos quatro tratamentos estudados.

Tabela 29. Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral dos quatro tratamentos.

Tratamentos (%)	Resistência Média	Desvio Padrão
0	0,63	0,06
10	0,73	0,14
30	0,983333	0,045092
50	1,113333	0,161658

O gráfico da Figura 55 apresenta a resistência à compressão diametral das diferentes formulações, com relação à fração dos aditivos incorporados nos tratamentos. Pode-se observar que um aumento no teor de aditivo na massa gera um aumento inicial da resistência, até que seja atingido um limite (cerca de 30%), quando começa a decair.

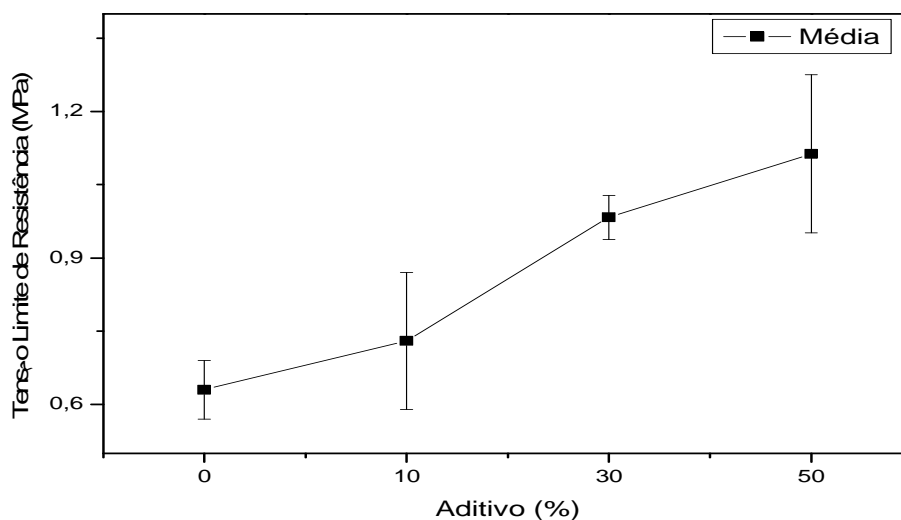


Figura 55. Ensaio de resistência à compressão diametral dos biocimentos incorporados com fármacos.

Teste de ANOVA

Os resultados referentes aos testes de tração diametral descrito na Tabela 30 foram submetidos a análise de variância (ANOVA de fator único) com nível de significância (α) de 5%, com o propósito de averiguar estatisticamente se a variação dos resultados é suficientemente diferente para que se conclua que as médias aritméticas das resistências à compressão diametral não são todas iguais, como mostra a tabela 30. Para esta análise foi utilizado o programa Origin[®] 8. Os testes foram realizados com estatística F.

Tabela 30. Análise de variância da resistência à tração por compressão diametral dos quatro níveis.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Aditivo	0,447358	3	0,149119	11,612157	0,002761
Resíduo	0,102733	8	0,012842		
Total	0,550092	11			

Ao realizar a ANOVA foi observado que o fármaco empregado influencia de maneira significativa as propriedades mecânicas dos biocimentos para um nível de confiança de 0,05. Neste caso, como o p-valor é menor do que o α especificado de 0,05 rejeitamos a hipótese nula de igualdade das médias, ou seja, podemos dizer que existe diferença estatisticamente significativa na média aritmética das resistências à compressão diametral dos biocimentos incorporados com droga no que concerne às duas formulações.

Teste de Tukey-Kramer

Como o teste ANOVA demonstrou haver diferenças entre os níveis, o método de comparações múltiplas de Tukey foi empregado para determinar quais tratamentos apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 31. Teste de Tukey-Kramer correspondente a resistência à compressão diametral dos biocimentos incorporados com fármaco.

Comparação Tratamentos	Diferença Absoluta	Erro-Padrão da Diferença	Intervalo Crítico
0 - 10	0,1	0,092526	0,29638
0 - 30	0,353333	0,092526	0,29638
0 - 50	0,483333	0,092526	0,29638
10 - 30	0,253333	0,092526	0,29638
10 - 50	0,383333	0,092526	0,29638
30 - 50	0,13	0,092526	0,29638

Desta análise, vemos que existem diferenças significativas entre os pares de média 0 – 30, 0 – 50 e 10 - 50, mas não entre os pares 0 – 10, 10 – 30 e 30 – 50. Isso implica que os biocimentos sem aditivo e 10% de aditivo, com 10% e 30% de aditivo e com 30% e 50 % de aditivo incorporados com 1% de fármaco produzem aproximadamente, a mesma resistência á compressão diametral e que todos os outros níveis testados de concentração produzem resistências diferentes, ou seja, é possível concluir, com 95% de confiança, que a formulação BCF-00 apresenta menor resistência á compressão diametral do que as formulações BCF-10, BCF-30 e BCF-50 e a formulação BCF-10 apresenta menor resistência do que a formulação BCF-30 e a formulação BCF-30 apresenta menor resistência do que BCF-50.

4.6 Comparação entre os Tempos de Pega dos Biocimentos com e sem o Fármaco

A fim de se verificar a influência da adição de fármaco sobre o tempo de pega dos biocimentos com e sem fármaco, foram plotados os gráficos de tempo inicial de pega (Figura 56) e tempo final de pega (Figura 57).

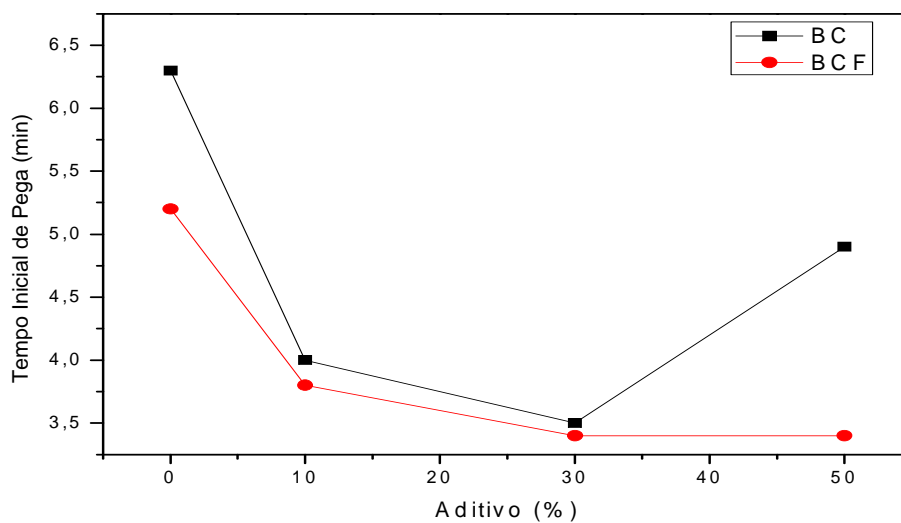


Figura 56. Comparação entre o tempo inicial de pega dos biocimentos BC e BCF.

Comparando-se os resultados obtidos na Figura 56, entre os tempos de pega das diferentes formulações propostas (BC e BCF), percebe-se que os biocimentos incorporados com fármaco apresentaram uma diminuição do tempo inicial de pega. Também foi observado (Figura 57) que todas as formulações com fármaco, exceto a amostra BCF-00, atingiram tempo final de pega superior às amostras BC-00, BC-10, BC-30 e BC-50.

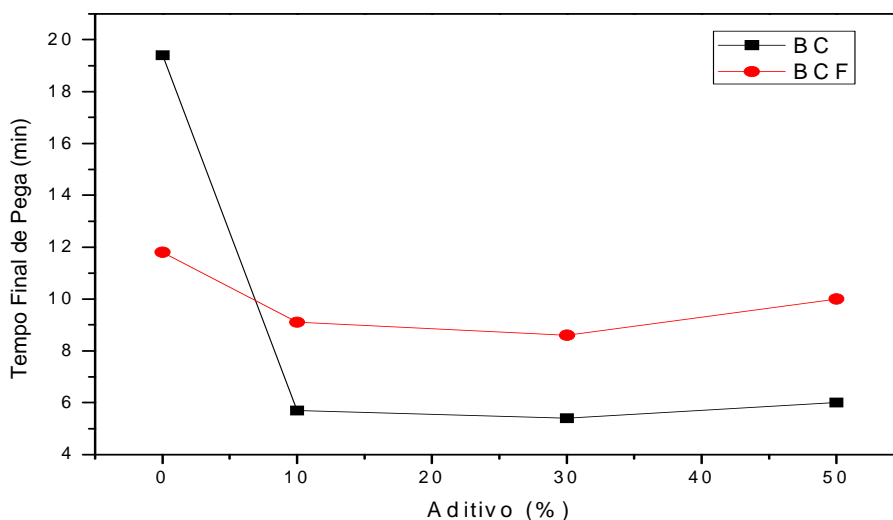


Figura 57. Comparação entre o tempo final de pega dos biocimentos BC e BCF.

4.7 Comparação entre as Resistências à Compressão Diametral dos Biocimentos com e sem o Fármaco

Para averiguar a influência da incorporação de fármaco sobre a resistência mecânica dos biocimentos com e sem fármaco, foi plotado o gráfico de resistência à compressão diametral (Figura 58).

Os resultados obtidos dos ensaios mostraram que a ampicilina causou um efeito negativo sobre a resistência à compressão diametral para os biocimentos com 10%, 30% e 50% de sulfato de cálcio di-hidratado, porém, o biocimento BCF-00 teve um aumento de resistência em torno de 6,78% comparado com a amostra BC-00.

Esse comportamento, provavelmente, está associado com alguma interação desconhecida entre o aditivo e o fármaco utilizado.

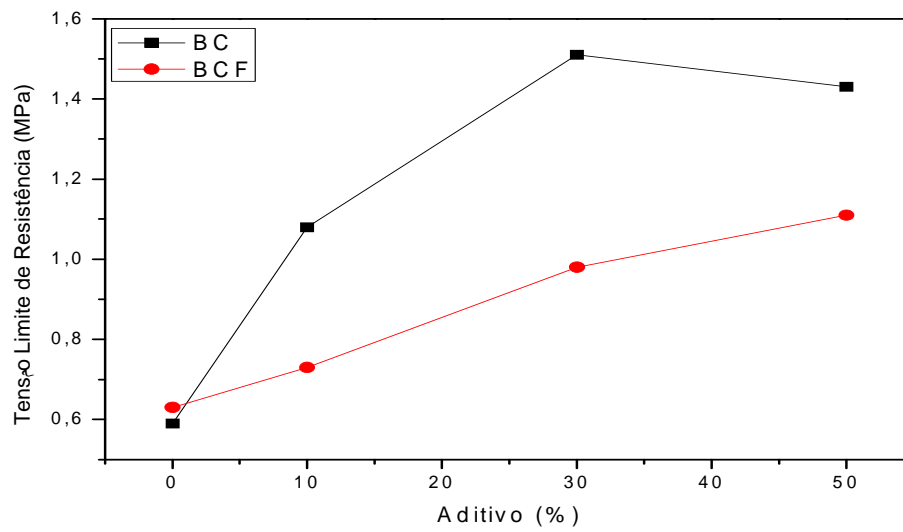


Figura 58. Comparação entre a resistência à compressão diametral dos biocimentos BC e BCF.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

O método de síntese permitiu a obtenção de pós de fosfato de cálcio formados por partículas nanométricas com diâmetro médio inferior a 100 nm.

Os biocimentos produzidos são constituídos basicamente pelas fases DCPD, β -TCP e CSD, conforme pode ser visto nos difratogramas de raios X.

Através da análise de EDX observaram-se, para a brushita (DCPD) formada, valores de 52,25% para o cálcio, 47,75% para o fósforo e uma razão estequiométrica Ca/P de 1,0.

A presença de grupos funcionais característicos dos fosfatos nas matrizes foi verificada através de espectroscopia de absorção na região de infravermelho.

Os estudos de caracterização pela técnica de microscopia eletrônica de varredura realizados nas superfícies de fratura das amostras evidenciaram as diferentes composições uma morfologia formada por fragmentos de cristais de diferentes formas e tamanhos.

As medidas de tempo de pega mostraram que a incorporação do sulfato de cálcio di-hidratado à matriz de fosfato de cálcio influenciou consideravelmente, ou seja, verificou-se uma diminuição significativa no tempo de pega. Houve uma redução de cerca de 22% no tempo de reação de endurecimento.

Para todas as formulações com incorporação de sulfato de cálcio di-hidratado, observou-se a diminuição gradual do pH, a maioria das formulações apresenta valores encontrados na faixa de pH concentrados entre 6.5 a 6.9. Isto é importante pelo fato que materiais com pH na faixa entre 6,5 a 8 são considerados adequados para aplicações clínicas.

Os resultados da resistência mecânica obtida através da média aritmética das resistências apresentaram-se coerentes, podendo-se concluir que a resistência à compressão diametral das formulações BC-10, BC-30 aumentou, o que pode ser decorrente da formação de cristais de DCPD, que fortalece os biocimentos em comparação à formulação sem o aditivo utilizado. De qualquer forma, as propriedades obtidas para essas composições às credenciam para uso em locais onde a solicitações por carga sejam menores, em especial, para o preenchimento de cavidades ósseas, no reparo de defeitos e fraturas.

A redução da resistência à compressão da formulação com 50% de sulfato de cálcio pode ser explicada devido ao aumento de porosidade, associada à maior quantidade de líquido na preparação.

Foi observado que a porosidade diminui com o aumento da concentração de sulfato de cálcio di-hidratado até 30% ocorrendo um aumento para concentrações maiores, caracterizando uma interferência do aditivo na estrutura.

A taxa de associação de CSD nos biocimentos de 10% modificou o perfil de liberação de ampicilina.

A análise do perfil de liberação utilizando os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas mostrou que a ampicilina é liberada dos biocimentos por um processo de transporte governado por difusão de Fick.

CAPITULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho consistiu na síntese de nanopartículas e obtenção de biocimentos como dispositivos para liberação controlada de fármacos. Vários resultados importantes foram obtidos e foi possível estabelecer conexões entre o comportamento na liberação da ampicilina e as propriedades estruturais das amostras estudadas. Entretanto, esses resultados são ainda preliminares e muito ainda deverá ser investigado para consolidar as idéias aqui desenvolvidas. Dessa forma, algumas sugestões seguem para trabalhos futuros.

Fazer um estudo de liberação da ampicilina utilizando outra técnica (HPLC) para confrontar os resultados encontrados com a técnica de espectrometria de UV.

Estudar os mecanismos cinéticos de liberação com diferentes fármacos em meios biológicos sob condições *in vitro*, para comprovar de forma efetiva o potencial dos biocimentos para serem utilizados como dispositivos de liberação controlada de drogas.

Analisar o comportamento bioativo dos biocimentos através da avaliação da formação da camada superficial de fosfato de cálcio em contato com o fluido corpóreo simulado.

Estudar os mecanismos cinéticos de biodegradação dos biocimentos em diferentes meios biológicos em termos da quantificação do teor de ampicilina liberada.

Estudar com mais detalhes as interações entre o fármaco (ampicilina) e o aditivo (sulfato de cálcio di-hidratado).

Completar o estudo de liberação de ampicilina “in vitro” para os biocimentos com 20% de sulfato de cálcio di-hidratado.

CAPITULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, H. L. R., “**Cimento Ósseo de Fosfato Tricálcio: Síntese e Influência de Aditivos na sua Injetabilidade**” Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – Belo horizonte-MG, 2006.
- AIRES, M. M., **Fisiologia**. Ed. Guanabara Koogh . Rio de Janeiro, 1991
- ANDERSSON, O. H.; DAHL, J. E., **Aluminium release from glass ionomer cements during early water exposure in vitro**. *Biomaterials*, v. 15 (11), p. 882-888, 1994.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G; ALLEN JR., L. V., **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 484p, 1999.
- AZEVEDO, M. M. M., **Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos**. Laboratório de Química do Estado Sólido, Instituto de Química – UNICAMP, 2002.
- BANWELL, C. N.; MCCASH, E. M., **Fundamentals of Molecular Spectroscopy**, New York: McGraw Hill, 1994.

- BASES DE DADOS - CAPES, Acesso em 26 fevereiro 2010, disponível em: <http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/sites>.
- BENS-NISSAN, B.; PEZZOTTI, G. **Bioceramics: Processing Routes and Mechanical Evaluation**. Journal of the Ceramic of Japan, v. 110, n. 7, p. 601-608, 2002.
- BERMUDEZ, O.; BOLTONG, M. G.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A., **Development of some calcium phosphate cements from combinations of α -TCP, MCPM and CaO**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine V. 5, p. 160-163, 1994.
- BERMUDEZ, O.; BOLTONG, M. G.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A., **Compressive strength and diametral tensile strength of some calcium - orthophosphate cements: a pilot study**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine , v.4, p. 389-393, 1993.
- BOHNER, M.; LEMAÎTRE, J.; VAN LANDUYT, P.; ZAMBELLI, P. Y.; MERKLE, H. P.; GANDER, B., **Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system**. J. Pharm. Sci. 86, 5: 565-572, 1997a.
- BOHNER, M.; VAN LANDUYT, P.; MERKLE, H. P.; LEMAITRE, J., **Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 8, p. 675-681, 1997b.
- BOHNER, M.; LEMAITRE, J.; RING, T. A., **Effects of sulfate, pyrophosphate, and citrate ions on the physicochemical properties of cements made of α -tricalcium phosphatephosphoric acid-water mixtures**. J. Am. Ceram. Soc., v. 79 (6), p. 1427-1434, 1996.

- BOHNER, M.; LEMAÎTRE J., **Hydraulic properties of tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures**. In: Third Euroceramics, Duran P, Fernández JF, eds., Faenza Editrice Ibérica SL, Castellón de la Plana, pp. 95-100, 1993.
- BOHNER, M., **Propriétés physico-chimiques et ostéogéniques d'un biociment hydraulique à base de phosphates de calcium**. PhD Thesis No. 1171, Swiss Federal Institute of Technology of Lausanne (EPFL), Lausanne, 1993.
- BROWN, W. E.; CHOW, L. C., **U. S. Patent 4, 518, 430**, 1985.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E., **Adsorption of gases in multimolecular layers**. Journal of the American Chemical Society 60:309-19, 1938.
- CARLSON, J.; NILSSON, M.; FERNÁNDEZ, E.; PLANELL, J. A., **Na ultrasonic pulseecho technique for monitoring the setting of CaSO₄ based bone cement**. Biomaterials, v. 24, p. 71-77, 2003.
- CARREÑO, N. L. V. ; FAJARDO, H. V. ; LEITE, E. R. ; PROBST, L. F. D.; LIBANORI, R., **Preparation, Characterization and Catalytic Properties of Titanium Oxide Nanoparticles Coated with Aluminum Oxide**. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, v. 102, p. 1-7, 2010.
- CARRODÉGUAS, R. G. **Cementos Óseos de Fosfatos de Cálcio**. Tesis de Doctorado, Centro de Biomateriales, Universidade de la Habana. Habana, Cuba, 2000.

- CARPINETTI, L. C. R., **Planejamento e análise de experimentos**. EESC-USP. São Carlos, 2000.
- CARREÑO, N. L. V.; GARCIA, I. T. S.; LEITE, E. R.; SANTOS, L.P.S.; LONGO, E.; FAJARDO, H. V. ; PROBST, L. F. D. ; FABBRO, M. T., **Ceramic Nanocomposites From High-Energy Mechanical Milling Process**. *Química Nova*, v. 31, p. 962-968, 2008.
- CASTELLAN, G. W.; Adsorção sobre Sólidos. In: **Fenómenos de Superfície**. Físico-Química. Livros Técnicos e Científicos, Editora – 3^a Ed. 452-463, 1978.
- CHANGSHENG, L.; WEI, G.; SONGHUA, P.; ZISHENG, L., **The exothermal behavior in the hydration process of calcium phosphate cement**. *Biomaterials – Elsevier Science-direct*, vol 24, 9p, 2003.
- CHEN, D. H., et al., **“Synthesis of nickel nanoparticles in aqueous cationic surfactant solutions”**, *Journal of Materials Chemistry*, 12, 2412-2415, 2002.
- CHENG, Z. H.; YASUKAWA, A.; KANDORI, K.; ISHIKAWA, T., **FTIR study on incorporation of CO₂ into calcium hydroxyapatite**. *Journal of Chemistry Society, Faraday Trans.* v.94, n.10, p.1501-1505, 1998.
- CHIEN, Y. W., **Novel Drug Delivery Systems**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1992.
- CHOW, L. C. **Development of self-setting calcium phosphate cements**. *J. Ceram. Soc. Jap. (The Centennial Memorial Issue)*, v. 99(10), p. 954-964, 1991.

- CONSTANTINO, P. D.; FRIEDMAN, C. D.; JONES, K.; CHOW, L. C.; PELZER, H. J.; SISSON, G. A. **Hydroxyapatite cement: I. Basic chemistry and histologic properties**. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., v. 117, p. 379-384, 1991.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S., **Modeling and comparison of dissolution profiles**. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 13, p. 123-133, 2001.
- COSTA, M. E. J. V., **Precipitação de Pós Cerâmicos** – Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro, 1988, 122p.
- CUNHA, S. M.; LAZAR, D. R. R.; USSUI, V.; FANCIO, E.; LIMA, N. B.; BRESSIANI, A. H. A., **“Sinterabilidade e Dureza de Cerâmicas a Base de Fosfatos de Cálcio Sintetizadas por Precipitação Homogênea”** - Anais do 50º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2006.
- CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O’CONNOR, C. J., **Recent Advances in the Liquid-Phases Syntheses of Inorganic Nanoparticles**, Chemical Review, 104, 3893-3946 2004.
- DALBY, M. J.; RIELHE, M.; HARTLEY, R.; JOHNSTONE, H.; AFFROSSMAN, S.; CURTIS, A. S. G., **Investigation of Cytoskeletal and Signalling Molecules Response to Topography**, European Society for Biomaterials, 2001.
- DAYANAND, C.; BHIKSHAMIAH, G.; TYAGARAJU, V. J.; SALAGRAM, M.; MURTHY, A.S.R., **Review Structural investigations of phosphate glasses: a detailed infrared study of the $x(\text{PbO})-(1-x)\text{P}_2\text{O}_5$ vitreous system**. Journal of Materials Science, 31, p.1945-1967, 1996.

- DE GROOT, K., **Bioceramics consisting of calcium phosphate salts.** *Biomaterials*, 1980, 1, 47.
- DELIMA, S. A.; CAMARGO, N. H. A.; AGUIAR, J. F.; GEMELLI, E.; TOMIYAMA, M., **Síntese e Caracterização de Pós de Fosfato de Cálcio e Compósitos Fosfato de Cálcio/Al₂O₃-a Nanoestruturado** – 510 Congresso Brasileiro de Cerâmico, Salvador-BA, 2007.
- DOWLING, A. P. - **Development of Nanotechnologies** - nanotoday, ISSN 1369 7021, p.30-35, 2004.
- DRIESSENS, F., **Chemistry and applied aspects of calcium phosphate bone cements. Concepts and clinical applications of ionic cements.** Sept. 8, Arcachon, France, 1999.
- DRIESSENS, F. C. M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A., **Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements.** *Anal. Quim. Int. Ed.*, v. 93, p. S38 - S43, 1997.
- DRIESSENS, F. C. M.; BOLTONG, M. G.; ZAPATERO, M. I.; VERBEECK, R. M. H.; BONFIELD, W.; BERMUDEZ, O.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; PLANELL, J. A., **In vivo behaviour of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* , v. 6, p. 272-278, 1995.
- DRIESSENS, F. C. M.; BOLTONG, M. G.; BERMUDEZ, O.; PLANELL, J., **Efective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* , v. 5, 164-170, 1994.

- DRIESSENS, F. C. M.; BOLTONG, M. G.; BERMÚDEZ, O.; PLANELL, J. A., **Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study**. , v. 4, p. 503-508, 1993.
- ENDERLE, R.; GOTZ-NEUNHOEFFER, F.; GOBBELS, M.; MULLER, F. A.; GREIL, P., **Influence of a magnesium doping on the phase transformation temperature of β -TCP ceramics examined by Rietveld refinement**, Biomaterials Vol. 26, p. 3379-3384, 2005.
- ELLIOT, J.C., **Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates**, Studies in Inorganic Chemistry Vol. 18, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1994.
- FARREL, S.; HESKETH, R. P., “**An Introduction to drug delivery for Chemical Engineers**”. 2002. Chemical Engineering Education. Disponível em <<http://engineering.eng.rowan.edu>>. Acesso em: 14/10/2010.
- FERNÁNDEZ, E.; PLANELL, J. A.; BEST, S. M., **Precipitation of carbonated apatite in the cement system - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ - CaCO_3** . Journal of Biomedical Materials Research, v. 47, p. 466-471, 1999.
- FERRAZ, M. P.; KNOWLES, J. C.; OLSEN, I.; MONTEIRO, F. J. AND SANTOS, J. D., **Flow Cytometry analysis of the effects of pre-immersion on the biocompatibility of glass reinforced hydroxyapatite plasma-sprayed coatings**, Biomaterials, 21, pp. 813-820, 2000.

- FERREIRA, A. L. O., **Síntese Enzimática de Ampicilina em Reator Integrado** Tese D.Sc., Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos – SP, Brasil, 190 pp, 2004.
- FRIEDMAN, C. D.; CONSTANTINO, P. D.; JONES, K.; CHOW, L. C.; PELZER, H. J.; SISSON, G. A., **Hydroxyapatite cement: II. Obliteration and reconstruction of the cat frontal sinus.** Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., v. 117, p. 385-389, 1991.
- FUKASE, Y.; EAMES, E. D.; TAKAGI, S.; CHOW, L. C.; BROWN, W. E. **Setting reactions and compressive strengths of calcium phosphate cements.** Journal of Dentistry Research, v. 69, p. 1852-1856, 1990.
- GARCIA DIAZ, A.; PHILLIPS, D.T., **Principles of experimental design and analysis.** Chapman & Hall. London, 1995.
- GBURECK, U.; VORNDRAN, E.; MÜLLER, F. A.; BARRALET, J. E., **Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices.** J. Control Release, 122:173-180, 2007.
- GIBSON, I. R.; AKAO, M.; BEST, S. M.; BONFIELD, W., **Phase transformations of tricalcium phosphates using high temperature x-ray diffraction,** Bioceramics, vol. 9, 173-176 1996.
- GINEBRA, M. P.; FERNÁNDEZ, E.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A., **The Effect of Na₂HPO₄ Addition on the Setting Reaction Kinetics of an [alpha]-TCP Cement.** *Biomaterials*. 1, Vol. 11, 1998.
- GINEBRA, M. P.; FERNÁNDEZ, E.; DRIESSENS, F. C. M.; BOLTONG, M. G.; MUNTASELL, J.; FONT, J.; PLANELL, J. A., **The effects of temperature on the behaviour of an apatitic calcium phosphate**

- cement.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 6, p. 857-860, 1995-a.
- GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; FERNÁNDEZ, E.; PLANELL, J. A.; DRIESSENS, F. C. M., **Effect of various additives and temperature on some preperities of an apatitic calcium phosphate cement.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine , v. 6, p. 612-616, 1995-b.
 - GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; FERNÁNDEZ, E.; PLANELL, J. A.; DRIESSENS, F. C. M. **Properties profile of Biocement H.** In: 21ST Annual Meeting of the Society for Biomaterials, San Francisco/EUA. Anais San Francisco: Society for Biomaterials, 1995-c.
 - GLEITER, H., **Nanostructured materials: State of art and perspectives.** in: 2nd Int. Conf. On Nanostructured Materials, 3-7 Out. Stuttgart, Germany, 1994.
 - GROVER, L. M, GBURECK, U.; YOUNG, A. M; WRIGHT, A. J; BARRALET, J. E., **Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of β -TCP-Pyrophosphoric acid bone cement.** J. Mater. Chem., 15: 4955-4962, 2005.
 - HAMMANISHI, C.; KITAMOTO, K.; TANAKA, S.; OTSUKA, M.; DOI, Y.; KITAHASHI, T., **A selfsetting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin.** J Biomed Mater Res Appl Biomater, 33:139-143, 1996.
 - HE, S.; YAO, J.; XIE, S.; PANG, S.; GAO, H., **Investigation of passivated silver nanoparticles,** Chemical Physical Letter, 343, 28-32, 2001.

- HENCH, L. L.; POLAK, J. M., **Third-Generation Biomedical Materials**, Science 295, 1014 – 1017, 2002.
- HENCH, L. L.; WILSON, J., **Introduction to bioceramics**. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., p. 1-15, 1993.
- HERCULIAN, P. P.; CESTARI, T. M.; TAGA, E. M.; TAGA, R., “**Enxertos Xenógenos: Tratamento de Defeito Ósseo Perene em Calvária de Cobaia com Membrana de Cortical Óssea Bovina Liofilizada Associada ou não a Enxerto Ósseo Bovino Desmineralizado**”, Revista Brasileira de Implante, 2000.
- HIGUCHI, T., **Mechanism of Sustained-Action Medication. Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices**. Journal of Pharmaceutic Science 52, 1145-1149, 1963.
- HONG, Y. C.; WANG, J. T.; HONG, C. Y.; BROWN, W. E.; CHOW, L. C., “**The periapical tissue reactions to a calcium phosphate cement in the teeth of monkeys**”. J. Biomed. Mater. Res., v. 25, p. 485-498, 1991.
- HULBERT, S. F.; BOKROS, J. C.; HENCH, L. L.; WILSON, J. and HEIMKE, G., In: **Ceramics in Clinical Applications**. Ed.: P. Vincenzini. Amsterdam: Elsevier, p. 3, 1987.
- HOU, J. P.; POOLE, J. W., **The amino acid nature of ampicillin and related penicillins**, Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 58, nº 12, p. 1510-1515, 1969.
- IKENAGA, M.; HARDOUIN, P.; LEMAITRE J.; ANDRIANJATOVO, H.; FLAUTRE, B., **Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous**

- biphasic calcium phosphate ceramics.** J Biomed Mater Res, 40:139-144, 1998.
- ISHIKAWA, K.; TAKAGI, S.; CHOW, L. C.; ISHIKAWA, Y., **Properties and mechanisms of fast-setting calcium phosphate cements.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 6, p. 528-533, 1995.
 - ISHIKAWA, K.; TAKAGI, S.; CHOW, L. C.; ISHIKAWA, Y.; EANES, E. D.; ASAOKA, K., **Behaviour of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro.** Dent. Mater, v. 10, p. 26-32, 1994.
 - JANSEN, J. A.; DE RUIJTER, J. E.; SCHAEKEN, H. G.; VAN DER WAERDEN, J. P. C. M.; PLANELL, J. A.; DRIESSENS, F. C. M., **Evaluation of tricalcium phosphate/hidroxyapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine , v. 6, p. 653-657, 1995.
 - JARCHO, M., **Retrospective Analysis of Hydroxyapatite Development for Oral Implant Applications.** Dent. Clin. North Am., v. 36, n. 1, p. 19-26, 1992
 - JOHNSON, JR., D. W., **Innovations in Ceramic Powder Preparation.** In: Messing, G. L. et al. (ed.) – Advances in Ceramics. V. 21. Ceramic Powder Science. Columbus, Ohio, The Amer. Ceram. Soc., p. 3-19, 1987.
 - JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., **Histologia Básica**, Guanabara Koogan, 9ª edição, 1999.
 - JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J., **Histologia Básica.** 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 101-9, 1990.

- KAMEGAI, A.; SHIMAMURA, N.; NAITOU, K.; NAGAHARA, K.; KANEMATSU, N.; MASAHIKO, M., **Bone formation under the influence of bone morphogenetic protein/self-setting apatite cement composite as a delivery system.** Biomed Mater Eng., 1994; 4: 291-307.
- KAMST, G. F.; VASSEUR, J.; BONAZZI, C.; BIMBENET, J. J., **A new method for the measurement of the tensile strength of rice grains by using the diametral compression test.** Journal of Food Engineering, v. 40, p. 227-232, 1999.
- KAUFMANN, E. N., **Characterization of materials.** v. 1, New Jersey: Wiley-interscience, 2003.
- KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L., **“Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar”**, Química Nova 23, Vol. 4, p. 518, 2000.
- KAWASHI, E. Y., **Fosfatos de Cálcio: Porosidade, Cristalinidade, Potencial de Interface e Comportamento in Vivo.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, 1997.
- KECSKES, L. J.; WOODMAN, R. H.; TREVINO, S. F.; KLOTZ, B.R.; HIRSCH, S. G.; GERSTEN, B. L., **Characterization of a Nanosized Iron Power by Comparative Methods** – KONA vol. 21, p.143-150, 2003.
- KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M., **“Novel Bioactive Materials with Different Mechanical Properties”**. Biomaterials, Vol. 24, nº 13, p. 2161-2175, 2003.

- KOKUBO, T.; ITO, S.; HUANH, Z. T.; HAYASHI, T.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T., **J. Biomed. Mater. Res.**, 24: 331-334, 1990.
- LAVERNIA, C.; SHOENUNG, J. M., **Calcium phosphate ceramics as bone substitutes**, Amer. Ceram. Soc. Bull. 70, 95-100, 1991.
- LAYMAN, D. L. e ANDOIN, R. C., **An *in vitro* system for studying osteointegration of dental implants utilizing cells grown on dense hydroxyapatite discks**. J. Biomed. Mater. Res., 40, 282, 1998.
- LEGEROS, R. Z., **Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. In: Monographs in Oral Science**. Edited: Howard M. Meyers, São Francisco, California, V. 15, 1991.
- LEMAITRE J., **Injectable calcium phosphate hydraulic cements: new developments and potential applications**. Innovations in Tech. Biol. Med., 16:109-120, 1995.
- LEMAITRE, J.; MUNTING, E.; MIRTCHI, A., **Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements**. Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac. V. 93(3), p. 163-165, 1992.
- LEMAITRE, J.; MIRTCHI, A.; MORTIER, A. **Calcium phosphate cement for medical use: state of the art and perspectives of development**. **Sil. Ind. Ceram. Sci. Technol.**, v. 52, p. 141-146, 1987.
- LEONG, K. W., LANGER, R., **Polymeric Controlled Drug Delivery**. Advanced Drug Delivery Reviews 1, 199-233, 1987.

- LEVINE, D. M.; STEPHAN, D. F.; KREHBIEL, T. C.; BERENSON, M. L., **Estatística: teoria e aplicações**. Livros Técnicos e Científicos Ltda, 2008.
- LIU, Y. L.; SCHOENARS, J.; GROOT, K.; WIJN, J. R; SCHEPERS, E., **“Bone Healing In Porous Implants; A Histologia And Histomerial Comparativc Study On Sheep”**, Journal Of Materials: Materials In Medicine, 11, pp. 711-717, 2000.
- MARION, R. H.; JOHNSTONE, J. K., **A Parametric Study of the Diametral Compression Test for Ceramics**. Ceramic Bulletin, v. 56, p. 998-1002, 1977.
- MARTIN, R. B.; BURR, D. R.; SHARKEY, N. A., **“Skeletal Tissue Mechanics”**, Springer, New York, 1998.
- MARZÁN, M. L., **Nanometals: formation and color**, Materials Today, 26-31, 2004.
- MCGREGOR, W. J., 1998, adaptação de AOKI, H., **Science and Medical Applications of Hydroxyapatite**, Pub. Japanese Association of Apatite Science, 1991.
- MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J.; MUNTING, E., **Calcium phosphate cements: effect of fluorides on the setting and hardening of α -TCP - DCPD - CC cements**. Biomaterials, v. 12, p. 505-510, 1991.
- MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J.; MUNTING, E., **Calcium phosphate cements: study of the α -TCP - DCPD - CC cements**. Biomaterials, v. 11, p. 83-88, 1990.

- MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J.; MUNTING, E., **Calcium phosphate cements: action of setting regulators on the properties of α -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements.** *Biomaterials*, v. 10, p. 634-638, 1989.
- MOUNT, G. J., **Atlas de cimentos de ionômero de vidro**, São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda., 1996.
- MUNTING, E.; MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J., **Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 4, p. 337-344, 1993.
- MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R., ***Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies***, *Annual Review of Materials Science*, 30, 545-610, 2000.
- NACHIONDO, J. M.; POSER, R. D.; GOODMAN, S. B.; CONSTANTZ, B. R., **Antibioitic impregnation of a resorbable calcium phosphate cement.** En: *Proceedings of the 20th Annual Meeting of the Society for Biomaterials*, Boston, p. 146, 1994.
- OGAWA, C. A.; PLEPIS, A. M., **Liberação *In Vitro* de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 12, nº 2, p. 115-122, 2002.
- OLIVEIRA, F. P., **Influência do processamento na obtenção de biocerâmicas à base de hidroxiapatita.** Dissertação para a obtenção do título de mestre em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.

- OLIVEIRA, M. M., **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades**, Tese (Doutorado), DQ-UFPR, Curitiba, 2005.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P., **Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos**. *Quím. Nova*, v. 27, n. 1, pp. 131-138, 2004.
- OLIVEIRA, M., **Síntese e caracterização de biomateriais à base de fosfato de cálcio**. Belo Horizonte: Escola de Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, 104p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas, área de concentração em Ciência e Engenharia de Materiais, linha de pesquisa em Biomateriais), 2004.
- OLIVEIRA, I. R.; STUDART, A. R.; PILEGGI, R. G.; Pandolfelli, V. C., **Dispersão e empacotamento de partículas**. Fazendo Arte Editorial, 2000.
- ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S., **Biomateriais-Fundamentos e Aplicações**, Rio de Janeiro, Ed.Cultura Médica, (2006).
- OTSUKA, M.; MATSUDA, Y.; YU, D.; WONG, J.; FOX, J. L.; HIGUCHI, W. I., **A novel skeletal drug delivery system for anti-bacterial drugs using self-setting hydroxyapatite cement**. *Chem. Pharm. Bull*, 38:3500-3502, 1990.
- OKAZAKI, M.; SATO, M., **Computer graphics of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate**. *Biomaterials*, v.11, p.573-578, 1990.

- PASCUAL, B.; VÁZQUEZ, B.; GURRUCHAGA, M.; GONI, I.; GINEBRA, M.P.; GIL, F. J.; PLANELL, J. A.; LEVENFELD, B.; SAN ROMÁN, J., **“New aspects of the effect of size and size distribution on the setting parameters and mechanical properties of acrylic bone cements.”** *Biomaterials*, v. 17 (5), p. 509-516, 1996.
- PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **“Microbiologia: Conceitos e Aplicações”**, 2º ed. Makron Books, São Paulo, 1996.
- PEPPAS, N. A., **Analysis of Fickian non-Fickian drug release from polymers**, *Pharm. Acta Helv.*, 60, 110, 1985.
- PEREIRA, G. J.; GOUVÊA, D., **Densificação rápida de cerâmicas de SnO₂**, *Cerâmica*, 49, p. 116-119, 2003.
- PEREIRA FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z., **Employment of factorial design for optimization of pirolisys and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS.** *Química Nova*. v. 25, n. 2, p. 246-253, 2002.
- PEREIRA, M. M., **“Implantes Bioativos”**, *Revista Minas faz Ciência* n° 3 – Fapeming, 2000.
- PIORINO NETO, F., **Estudo do ensaio de anel em compressão diametral para caracterização de cerâmicas em temperaturas ambiente e elevadas.** 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Faculdade de Engenharia Química, Lorena, 2000.
- PIRATELLI FILHO, A., **Método para avaliação do desempenho de máquinas de medir a três coordenadas através de planejamento de**

- experimentos.** São Carlos. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997.
- PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P., **The design of optimum multifactorial experiments.** Biometrika, n.33, p.305-25, 1946.
 - PRADO DA SILVA, M. H.; LEMOS, A. F.; FERREIRA, J. M. F.; LOPES, M. A.; SANTOS, J. D., **Production of Porous Biomaterials Based on Glass-Reinforced Hydroxyapatite Composites,** Key Eng. Materials. v. 230, p.483-486, 2002a
 - PRADO DA SILVA, M. H.; LEMOS, A. F.; GIBSON, I. R.; FERREIRA, J. M. F. and SANTOS, J. D., **“Porous Glass Reinforced Hydroxyapatite Material Produced With Different Organic Additives”**, Journal Of Non-Crystalline Solids, 304, pp. 286-292, 2002b.
 - PRADO DA SILVA, M. H., **“Recobrimento de Titânio com Hidroxiapatita: Desenvolvimento de Processo Eletrolítico e Caracterização Biológica In Vitro”**, Tese D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 166 pp, 1999.
 - RAMESH, S., **Properties Correlation in Polycrystalline Hidroxiapatite Bioceramic.** Malaysian Journal of Chemistry, Vol. 3 nº 1, 0035 – 0040, 2001.
 - RANADE, V., **Drug Delivery Systems.** 2. ed. London: CRC Press, 2003.
 - RAO, C. N. R. and CHEETHAM, A. K., **Science and technology of nanomaterials: current status and future prospects,** Journal of Materials Chemistry, 11, 2887-2894, 2001.

- RAUSCHMANN, M. A.; WICHELHAUS, T. A.; STIRNAL, V.; DINGELDEIN, E.; ZICHNER, L.; SCHNETTLER, R.; VOLKER ALT, V., **Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections**, *Biomaterials*, vol. 26, pp. 2677-2684, 2004.
- RATIER, A.; GIBSON, I. R.; BEST, S. M.; FRECHE, M.; LACOUT, J. L.; RODRIGUES, F., **Setting characteristics and mechanical behaviour of calcium phosphate bone cement containing tetracycline**. *Biomaterials*, v. 22, p. 897-901, 2001.
- RATNER, B. D., **Biomaterials Science: An Introduction to Materials In Medicine**. San Diego: Academic Press, 484 p, 1996.
- REGÍ, M. V.; VILLAREJO, A. L. D., **Liberación de Fármacos en Matrices Biocerámicas: Avances y Perspectivas**. Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia – Monografía XIX, 2006.
- REHMAN, I. U.; BONFIELD, W., **Characterisation of Hydroxyapatite and Carbonated Apatite by Photo Acoustic FTIR Spectroscopy**. *Journal of Materials Science; Materials in Medicine*, vol. 8, pp. 1-4, 1997.
- RIBEIRO, D. V., **Influência da Adição de Pó de Retífica em uma Matriz de Cimento de Fosfato de Magnésio**. Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, 2006.
- RIBEIRO, C., **Processamento e caracterização de cerâmicas a base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico**. Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais,

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2003.

- RIGO, E. C. S.; OLIVEIRA, L. C.; SANTOS, L. A.; BOSCH, A. O.; CARRODEGUAS, R. G., **Implantes Metálicos Recobertos com Hidroxiapatita**. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, V. 15, n. 1-2. p. 21-29, 1999
- RÜBERG, T., **Computer simulation of adaptive bone remodeling**. Technische Universität Braunschweig, Centro Politécnico Superior Zaragoza, 2003.
- RYU, H. S.; YOUN, H. J., HONG, K. S.; CHANG, B. S.; LEE, C. K.; CHUNG, S. S., **An improvement in Sintering property of β -Tricalcium Phosphate by addition of calcium pyrophosphate**, Biomaterials 14, Vol. 23, p. 909-914, 2002.
- SANTANA, J. G. A., **Desenvolvimento de Cerâmicas Multicamadas de Carbetto de Silício Destinadas a Aplicações Térmicas**. Tese para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica na área de Projetos e Materiais, Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratingueta, Universidade Estadual Paulista, 2010
- SANTOS, L. A., **Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para uso na Área Médico Odontológica**. Tese para obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2002.
- SENE, F. F., **Síntese e caracterização de vidros niobofosfatos de bário e potássio para aplicação como matriz hospedeira de ions de**

- terras raras.** Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2002.
- SHINDO, M. L.; CONSTANTINO, P. D.; FRIEDMAN, C. D.; CHOW, L. C. **Facial skeletal augmentation using hydroxyapatite cement.** Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., v. 119, p. 185-190, 1993.
 - SIMÓ, C., CIFUENTES, A. GALLARDO, A., **Drug delivery systems: Polymers and drugs monitored by capillary electromigration methods.** Journal of Chromatography B, v. 797, p. 37- 49, 2003.
 - SINGH, M., **Influence of blended gypsum on the properties of portland cement and Portland slag cement.** Cement and Concrete Research. v. 30, p. 1185-1188, 2000.
 - SMITH, W. F., **Princípios de ciência e engenharia dos materiais.** 3. ed. Lisboa: Mc-Graw Hill de Portugal, 891p,1998.
 - SMITH, K. L.; HERBIG, S. M., **Controlled Release.** *In: Membrane Handbook*, Nova Iorque, 915,1992.
 - SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., **Princípios de Análise Instrumental**, 5 ed., Porto Alegre: Bookman, 2002.
 - SOUSA, A., **Materiais Mesoporosos Ordenados Aplicados como Sistemas para Liberação Controlada de Drogas.** Dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2005

- SPIM, J. A.; SANTOS, C. A.; GARCIA, A., **Ensaio dos Materiais**, LTC: Livros Técnicos e Científicos, Editora S.A, vol. 1, 247 p. Rio de Janeiro – RJ, 2000.
- STANLEY, P., **Mechanical strength testing of compacted powders**. International Journal of Pharmaceutics. v. 227, n. 1-2, p. 27-38, Oct. 2001.
- TAKECHI, M.; MIYAMOTO, Y.; ISHIKAWA, K.; NAGAYAMA, M; KON, M.; ASAOKA, K; SUZUKI, K., **Effects of added antibiotics on the basic properties of antiwashout-type fast-setting calcium phosphate cement**. Journal of Biomedical Materials Research, v. 39, p. 308-316, 1998.
- TAKECHI, M.; MIYAMOTO, Y.; ISHIKAWA, K.; YUASA, M.; NAGAYAMA, M.; KON, M.; ASAOKA, K. **Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement using chitosan**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine , v. 7, p.317-322, 1996.
- TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S., **Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno**. Química Nova. vol. 24, n.6, pp. 808-818, 2001.
- TENHUISEN, K. S.; BROWN, P. W., **The kinetics of calcium deficient and stoichiometric hydroxyapatite formation from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$** . Journal of Materials Science: Materials in Medicine , v. 7, p. 309-316, 1996.
- TERKELTAUB, R. A., **Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology**. Am. J. Physiol Cell Physiol, 281: 1-11, 2001.

- TONIOLO, J. C., **Síntese de pós de alumina nanocristalina por combustão em solução**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 61p, 2004.
- VAN BLITTERSWIJK, C. A.; GROTE, J. J.; KUÿPERS, W.; BLOK-VAN HOEK, C. J. G.; DAEMS, W. T., **Bioreactions at the tissue/hydroxyapatite interface**, *Biomaterials*, 6, 246, 1985.
- VAN VLACK, L. H., **Propriedades mecânicas e aplicações**. In: *Propriedades dos materiais cerâmicos*. São Paulo: Edgard Blucher, p. 109-129, 1973
- VIAU, G.; FIÉVET-VINCENT, F.; FIÉVET, F., **Nucleation and growth of bimetallic CoNi and FeNi monodisperse particles prepared in polyols**, *Solid State Ionics*, 84, 259-270, 1996.
- VIEIRA, S., **Análise de Variância (ANOVA)**, Editora Atlas, São Paulo, 2006.
- VIEIRA, M. F., **Separação de Ampicilina Produzida Enzimaticamente por Reação entre Ester Metílico de Fenilglicina e Ácido 6-aminopenicilânico**. Tese D. Sc., Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos – SP, 2003.
- WILLIAMS, D. F., **The Williams Dictionary Of Biomaterials**, Liverpool, UK, Liverpool University Ptreess, 1999.
- WILLIAMS, J. A.; BILLINGTON, R.W.; PEARSON, G.J., **Zinc phosphate cements: an evaluation of some factors influencing the lactic acid jet test erosion**. *Biomaterials*, v. 15 (12), p. 1008-1012, 1994.

- WILLIAMS, D. F., **Definitions in biomaterials**, Progress in Biomedical Engineering, v.4, 1987.

APÊNCICE A - Caracterização dos Pós de Fosfato de Cálcio

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise dos espectros na região do infravermelho é uma ferramenta importante para uma avaliação qualitativa da presença de grupos inorgânicos (fosfatos). Como também é uma análise complementar à análise de difração de raios-X. Para verificar a eficácia do processo de obtenção dos pós de fosfatos de cálcio identificaram-se as bandas características.

A figura 59 mostra os resultados de espectroscopia de infravermelho da amostra precipitada em pH 8 não sinterizada.

Os espectros das amostras verdes mostraram bandas alargadas características da água a 3425 cm^{-1} e 1595 cm^{-1} atribuídas ao processo de precipitação aquosa. A fraca banda de absorção a 874 cm^{-1} é atribuída à vibração P-O-H do grupamento HPO_4^{-2} confirmando a obtenção de uma apatita deficiente em cálcio. A vibração C-O do grupo CO_3^{-2} pode contribuir para essa banda de absorção.

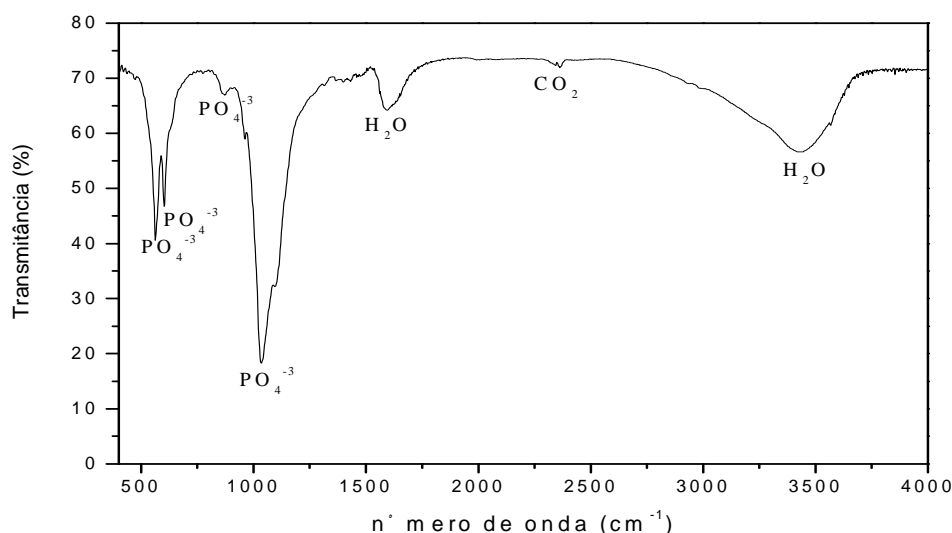


Figura 59. Espectroscopia de Infravermelho do pó precipitado em pH 8 (não sinterizado).

Difração de Raios X (DRX) - Pó Sinterizado

Utilizando-se da técnica de difração de raios-X, foram obtidos difratogramas de raios X dos pós de partida precipitados a partir de solução aquosa, ajustados com hidróxido de amônio em pH 8 (figura 60) para confirmar a presença das fases características deste material e sinterizados em 1200°C a uma taxa de 5° C por minuto durante 2 horas.

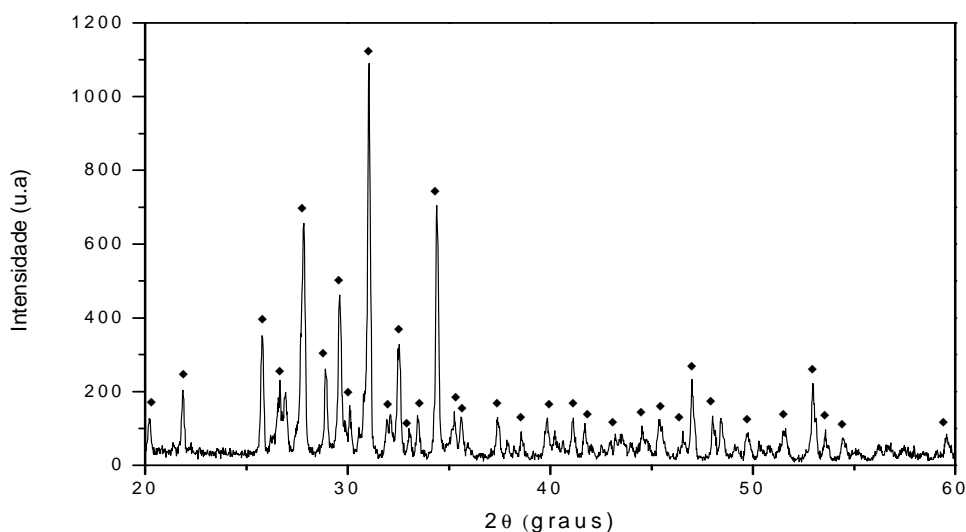


Figura 60. Difratograma de raios X para o pó precipitado em pH 8 e sinterizado a 1200°C.

Os resultados de caracterização obtidos pela difratometria de raios X realizado sobre o pó sinterizado a 1200° C revelaram em seu espectro (figura 22) a presença predominante da fase cristalina de fosfato de cálcio na composição $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Todos os picos foram analisados e corresponde aos encontrados na ficha cristalográfica JCPDS – 070-2065, apresentando plano principal de difração [214] para a composição sintetizada. Observou-se para o β -TCP, uma razão estequiométrica Ca/P de 1,43, enquanto a teórica corresponde a 1,50.

Apatitas cálcio deficiente, $[\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}]$ com $0 \leq x \leq 1$,

podem ser obtidas através de uma precipitação aquosa clássica onde o valor de x vai depender de parâmetros tais como pH e temperatura principalmente. O primeiro deve ser mantido perto da neutralidade, levemente ácido e geralmente utilizam-se baixas temperaturas de síntese. A cinética de formação dos precipitados esta diretamente vinculada ao tempo de envelhecimento da síntese.

Determinação da Distribuição do Tamanho de Partículas (BET)

A área superficial específica, a área do microporo, o volume do microporo e o diâmetro médio do poro dos pós de fosfato de cálcio sintetizado via precipitação em solução aquosa em valor de pH 8 e sinterizado em temperatura de 1200° C a uma taxa de 5° C por minuto foi determinada utilizando a técnica de adsorção de nitrogênio (BET). A partir dos resultados da análise de área superficial foi possível obter o tamanho médio teórico das partículas do material através da equação 26. Os resultados obtidos são reportados na tabela 32.

Tabela 32. Resultados obtidos das análises por BET.

Amostra	Área Superficial BET (m ² /g)	Diâmetro Médio das Partículas (nm)	Área do Microporo (m ² /g)	Volume do Microporo (cm ³ /g)	Diâmetro Médio do Poro (nm)
Pós	83,00	23	108,4	0,0383	19,98

Pode-se verificar que os pós sintetizados são considerados nanopartículas, com diâmetro médio das partículas inferior a 100 nm.

O valor da área superficial específica determinado na tabela 32, esta intimamente relacionada com o diâmetro médio das partículas que compõe os

fosfatos de cálcio. Quanto menor o tamanho das partículas, maior a área superficial específica (Teixeira, et. al., 2001).

Pós cerâmicos de área superficial elevada tendem a formar aglomerados, como pode ser observado na figura 61.

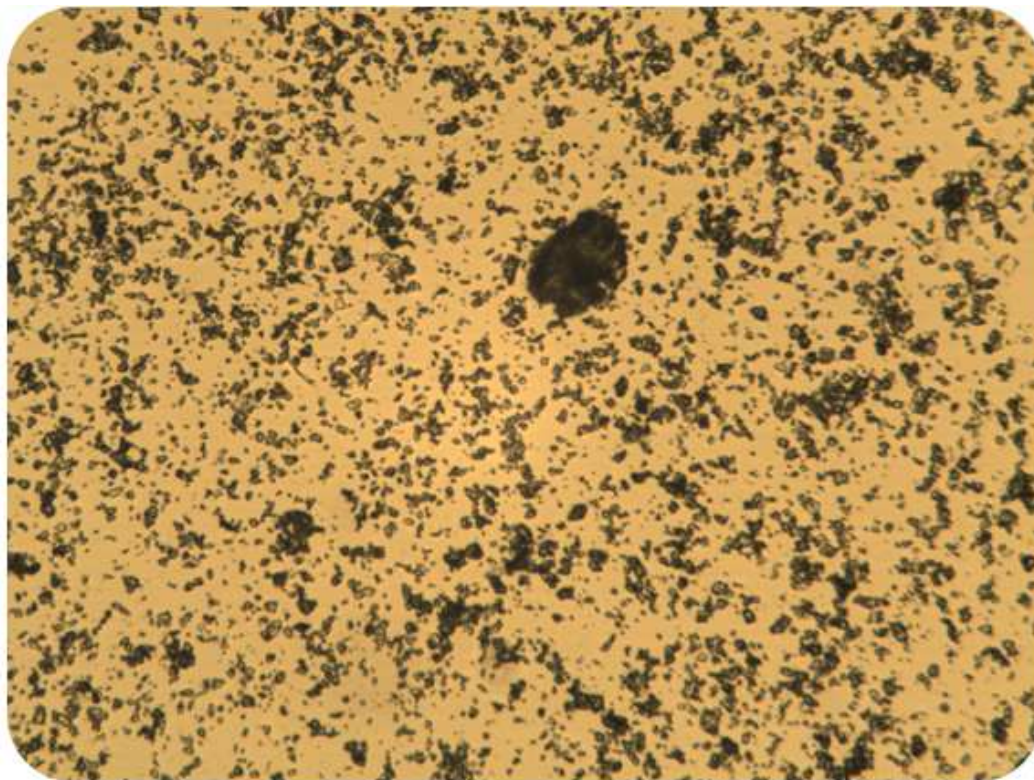


Figura 61. Micrografia ótica do pó sinterizado a 1200° C (130X).

As partículas muito finas tendem a se aglomerar em decorrência da maior intensidade das forças atrativas sobre as repulsivas, devido a distribuição de cargas nas superfícies. Normalmente, partículas de dimensões pequenas suspensas em meio líquido tendem a se movimentar rapidamente e aleatoriamente decorrente do impacto das moléculas do líquido contra a superfície, facilitando a aglomeração. A intensidade do impacto é mais significativa para partículas pequenas e com isso a aglomeração é favorecida (Oliveira, et. al., 2000).

APÊNDICE B - Resultados Obtidos para os Ensaios Químicos e Mecânico dos Biocimentos (DCPD/ β -TCP)

Tabela 33. Resultados individuais das caracterizações físico-química dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Biocimento	Aditivo (%)	T _i (min)	T _f (min)	pH	Resistência Mecânica (MPa)	Porosidade
BC-00	0	6,4	18,4	7,2	0,54	55,66
BC-00	0	6,6	20,5	7,3	0,64	51,92
BC-00	0	5,8	19,2	7,2	0,6	50
BC-10	10	3,4	6,3	7,2	1,05	57,32
BC-10	10	4,2	5,4	6,5	1,08	52,7
BC-10	10	4,3	5,5	6,8	1,12	46,34
BC-30	30	3,5	5,3	6,2	1,44	51,35
BC-30	30	3,6	5,5	6,5	1,57	50
BC-30	30	3,4	5,3	6,3	1,51	47,89
BC-50	50	5,2	6,1	6,1	1,53	52,33
BC-50	50	5,4	5,3	6,8	1,41	51,22
BC-50	50	4,2	6,5	6,5	1,35	50,22

APÊNDICE C - Resultados Obtidos para os Ensaio Químicos e Mecânico dos Biocimentos Incorporados com Fármacos

Tabela 34. Resultados individuais das caracterizações físico-química dos biocimentos incorporados com fármacos.

Biocimento	Aditivo (%)	T _i (min)	T _f (min)	Resistência Mecânica (MPa)
BCF-00	0	4,2	10,4	0,57
BCF-00	0	6,2	16,6	0,69
BCF-00	0	5,3	8,4	0,63
BCF-10	10	4,7	8,5	0,87
BCF-10	10	3,4	10,2	0,59
BCF-10	10	3,3	8,5	0,73
BCF-30	30	3,4	10,8	0,94
BCF-30	30	4,6	9,3	1,03
BCF-30	30	2,3	5,6	0,98
BCF-50	50	3,2	6,3	1,14
BCF-50	50	3,5	9,8	1,26
BCF-50	50	3,6	14,4	0,94

APÊNDICE D - Teste de Homogeneidade da Variância dos Biocimentos (DCPD/ β -TCP) (Teste de Levene)

Tabela 35. Teste de Levene correspondente ao tempo inicial de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p -valor
Aditivo	3,57387E-4	3	0,0958	3,31624	0,07779
Resíduo	0,23111	8	0,02889		

Tabela 36. Teste de Levene correspondente ao tempo final de pega dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p -valor
Aditivo	0,6737	3	0,22457	2,39657	0,14366
Resíduo	0,74963	8	0,0937		

Verificamos que o p -valor do teste é maior que o nível de significância escolhido de 5% para o tempo de pega inicial e final, portanto não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias.

Tabela 37. Teste de Levene correspondente ao pH. dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	<i>p</i> -valor
Aditivo	0,09	3	0,03	1,65306	0,25309
Resíduo	0,14519	8	0,01815		

O teste de Levene testa a hipótese nula, como o *p*-valor é maior que 5%, não temos evidências para rejeitar a hipótese de igualdade de variâncias.

Tabela 38. Teste de Levene correspondente a resistência à compressão diametral dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	<i>p</i> -valor
Aditivo	0,00289	3	9,61728E-4	0,9671	0,45422
Resíduo	0,00796	8	9,94444E-4		

Com base na tabela 38, o *p*-valor é maior que o valor α especificado (0,05). Observa-se não existem diferenças significativas entre as quatro variâncias, ou seja, é razoável pressupor que as concentrações das quatro formulações produzem resistência com igual quantidade de variabilidade.

Tabela 39. Teste de Levene correspondente a porosidade dos biocimentos (DCPD/ β -TCP).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	<i>p</i> -valor
Aditivo	17,0124	3	5,6708	2,07176	0,18244
Resíduo	21,89756	8	2,73719		

O teste de Levene testa a hipótese nula, como o p-valor é maior que 5%. Por conseguinte não existem evidências significativas entre as quatro variâncias, ou seja, é razoável pressupor que as concentrações das quatro formulações produzem resistência com igual quantidade de variabilidade.

APÊNDICE E - Teste de Homogeneidade da Variância dos Biocimentos Incorporados com Fármacos (Teste de Levene)

Tabela 40. Teste de Levene correspondente ao tempo inicial de pega dos biocimentos incorporados com fármacos.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	<i>p</i> -valor
Aditivo	0,687407	3	0,229136	1,168398	0,380327
Resíduo	1,568889	8	0,196111		

Tabela 41. Teste de Levene correspondente ao tempo final de pega dos biocimentos incorporados com fármacos.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	<i>p</i> -valor
Aditivo	10,567407	3	3,522469	1,586896	0,267082
Resíduo	17,757778	8	2,219722		

Verificamos que o *p*-valor do teste é maior que o nível de significância escolhido de 5% para o tempo de pega inicial e final, portanto não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias.

Tabela 42. Teste de Levene correspondente a resistência à compressão diametral dos biocimentos incorporados com fármacos.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	<i>p</i> -valor
Aditivo	0,015096	3	0,005032	1,39601	0,312937
Resíduo	0,028837	8	0,003605		

Com base na tabela 42, o p-valor é maior que o valor α especificado (0,05). Observa-se não existem diferenças significativas entre as quatro variâncias, ou seja, é razoável pressupor que o fármaco incorporado nas quatro formulações produz resistência com igual quantidade de variabilidade.

ANEXO A - Modelos Matemáticos de Higuchi e de Korsmeyer-Peppas

Higuchi desenvolveu diversos modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes sólidas e semi-sólidas. A equação de Higuchi foi inicialmente empregada para sistemas planares, sendo depois modificada para considerar diferentes geometrias dos sistemas matriciais. O modelo de Higuchi é um modelo aproximado e fundamentado na primeira lei de Fick. Esse modelo assume que a droga na camada superficial do sistema dissolve-se na matriz e difunde-se para fora da mesma. Quando o teor do agente na superfície esgota-se, a próxima camada começa a exaurir. A cinética de liberação pode ser descrita pela equação de Higuchi (eq. 50), onde uma reta é esperada para a quantidade liberada em função da raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$) para sistemas baseados no mecanismo de difusão (Costa & Lobo, 2001).

$$M_t = Kt^{1/2} \quad \text{eq. (50)}$$

onde, M_t é a quantia total de droga liberada, k é a constante de liberação e t é o tempo.

A aplicação do modelo de Higuchi segue alguns postulados:

- a) A concentração inicial da substância no sistema deve ser muito maior que a sua solubilidade no meio;
- b) A análise matemática é baseada em uma difusão unidimensional;
- c) A substância é considerada em estado molecularmente disperso com partículas muito menores em diâmetro que a espessura do sistema;
- d) A dissolução da matriz carreadora é negligenciável;
- e) A difusibilidade da substância é constante.

Para simplificar a análise dos dados de sistemas de variadas geometrias,

uma expressão empírica exponencial foi desenvolvida para relacionar a liberação fracional do fármaco com o tempo de liberação (eq. 51). Este é o modelo de Korsmeyer-Peppas, também chamado lei da potência (Costa & Lobo, 2001).

$$\frac{M_t}{M_0} = K t^n \quad \text{eq. (51)}$$

onde, M_t/M_0 é a liberação fracional do soluto (M_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t ; M_0 é a quantidade de fármaco liberada no tempo infinito), t é o tempo de liberação, K é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica e n é o expoente de liberação, característico do mecanismo de liberação (Costa & Lobo, 2001). A lei de potência aplica-se até 60% da quantidade total do fármaco liberado. Prediz que a liberação fracional do fármaco é exponencialmente relacionada ao tempo de liberação e descreve adequadamente a liberação do fármaco a partir de esferas, barras, cilindros e discos. Os parâmetros da equação 51 podem ser obtidos a partir da equação 52.

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_0}\right) = \ln K + n \ln t \quad \text{eq. (52)}$$

A inclinação (n) de um gráfico correlacionando \ln da concentração do fármaco liberado *versus* \ln do tempo é 0,5 para difusão que puramente segue a lei de Fick (tabela 43). Um padrão que não segue a lei de Fick ($0,5 < n < 1,0$ ou $0,45 < n < 0,89$) é observado quando a proporção de penetração do solvente e a liberação do fármaco estão num mesmo patamar.

Tabela 43. Relação entre o valor n e o mecanismo de liberação controlada (Peppas, 1985).

Expoente de Liberação (n)	Mecanismo de Liberação de Fármaco
0,5	Difusão de acordo com a lei de Fick
$0,5 < n < 1$	Transporte anômalo (não Fickiano)
1	Ordem zero