



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

SUELY ALVES SILVA

OBTENÇÃO DE BIOCIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA APLICAÇÃO
COMO DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

FORTALEZA

2018

SUELY ALVES SILVA

OBTENÇÃO DE BIOCIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA APLICAÇÃO
COMO DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

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

Área de concentração: Processos de Transformação e Degradação dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S583o Silva, Suely Alves.
Obtenção de biocimento de fosfato de cálcio para aplicação como dispositivo de liberação de fármaco /
Suely Alves Silva. – 2018.
110 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação
em Engenharia e Ciência de Materiais, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira.
1. Biomateriais. 2. Biocerâmica. 3. Biocimento. 4. Fármaco. I. Título.

CDD 620.11

SUELY ALVES SILVA

OBTENÇÃO DE BIOCIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA APLICAÇÃO
COMO DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciências de Materiais.

Área de concentração: Processos de Transformação e Degradação dos Materiais.

Aprovada em: 08/05/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pierre Basilio Almeida Fechine
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cândido Jorge de Sousa Lobo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Halisson de Souza Pinheiro
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof^a. Dr^a. Emmanuelle de Oliveira Sancho
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

À Deus.

À Nossa Senhora das Graças.

Aos meus pais, Jose e Socorro.

Aos irmãos, Susi e Adson.

E ao meu noivo Márcio.

Pelo amor, carinho, compreensão e incentivo transmitidos em todos os momentos.

Esta conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a realização de mais um sonho, muito obrigada Senhor, sem você, eu não seria ninguém!

À Nossa Senhora das Graças e Nossa Senhora Desatadora dos Nós, por ouvir minhas preces e interceder por mim junto ao seu filho, durante todos esses anos de pós-graduação. Obrigada minha Nossa Senhora, por mais essa Graça recebida!

Aos meus pais Jose Silva e Socorro, meus irmãos Susi e Adson. Pelo imenso amor que vocês me transmitem, pelas orações, pelas promessas, pela paciência, pelo grande apoio nas minhas decisões e por me aguentar nos momentos de estresse, tristeza e choro. Se hoje estou onde estou, foi por ter sempre vocês comigo. Sem vocês eu não conseguiria. Meu amor por vocês é incondicional!

Ao meu amor, amigo, namorado e noivo Márcio. Muito obrigada pelo imenso apoio, por sempre acreditar no meu sonho, por não deixar eu desistir e por me ensinar que devo ser mais forte. Te amo!

À minha Tia Lourdes, pelas suas poderosas orações e por me ensinar que Jesus nunca nos abandona.

Aos meus cunhados, Emanuel e Eliza, por sempre torcer pelas minhas conquistas.

À minha fiel cadela e filhinha Bolinha, por sempre prestar atenção nos meus ensaios, mesmo acabando dormindo de tanto eu repetir. Pelo seu carinho nos momentos de choro, por dizer na expressão do seu olhar. – Mãe, vai dar certo, fica calma!

Ao meu eterno orientador Prof. Dr. Ricardo Emílio, por sempre acreditar que eu conseguiria, por não me deixar desistir, pelos ensinamentos, pela humildade e pelo exemplo de pessoa que é. Muito obrigada, por tudo!

Ao colega Dr. José Silvio Veras Albuquerque pelos seus ensinamentos e valiosas correções. Muito obrigada.

Aos amigos Joelane, Kamila e Éden pelos momentos de alegria, tristezas, companheirismo e ajuda.

Ao professor Dr. Cleiton Carvalho Silva Coordenador do Programa.

Ao Laboratório de Magnetismo e Materiais Magnéticos, coordenado pelo professor Dr. Igor, por sua acessibilidade, sempre autorizando o uso do moinho de alta energia.

Ao Laboratório de Raios-X, coordenado pelo professor Dr. Sasaki, e aos técnicos Edipo e Valéria, por suas atenções para com minhas amostras.

Aos professores participantes da banca examinadora: Dr. Pierre Basílio, Dr. Halisson Pinheiro, Dra. Emmanuelle Sancho e Dr. Cândido Lobo, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação, por acreditar na minha pesquisa.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar, porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.” (Cora Coralina)

RESUMO

Um dos maiores desafios da ciência nos últimos anos tem sido o desenvolvimento de tecnologias para a produção de veículos (ou carreadores) que permitam a liberação controlada de fármacos no organismo humano, possibilitando a redução das doses dos medicamentos, tornando-os ao mesmo tempo mais eficazes. Uma das formas de fazer uso racional e efetivo dos fármacos é precisamente sua administração local e controlada. Nesta pesquisa, foi sintetizado o β -Fosfato Tricálcico (β -TCP), por reação via estado sólido, com o objetivo principal de produzir um biocimento para avaliar a incorporação e liberação do fármaco Indometacina, que é um anti-inflamatório. O β -TCP foi caracterizado por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho (IV), Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (MEV-EDS), e determinação do tamanho médio de partículas (BET). Também foi realizado o ensaio de citotoxicidade seguindo as normas ISO 10993-5 e ISO 10993-12. O biocimento foi caracterizado por DRX, MEV, determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH), porosidade aparente, tempo de pega e resistência à compressão diametral. Após a Incorporação e Liberação do fármaco Indometacina no biocimento foram realizados o estudo da liberação, as determinações do tempo de pega e da resistência à compressão diametral e a análise estatística ANOVA dos resultados. As caracterizações realizadas demonstraram que a reação em fase sólida de hidróxido de cálcio e hidrogeno fosfato de cálcio permite a obtenção de β -TCP monofásico, desde que seja empregada a combinação adequada dos parâmetros de síntese. Portanto, o material obtido não apresenta toxicidade, é biocompatível e se mostra um forte candidato para aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Biomateriais. Biocerâmica. Biocimento. Fármaco.

ABSTRACT

One of the major challenges of science in recent years has been the development of technologies for the production of vehicles (or carriers) that allow the controlled release of drugs in the human body, making it possible to reduce the doses of medicines, making them at the same time more effective. One way to make rational and effective use of drugs is precisely their local and controlled administration. In this study, β -TCP was synthesized by solid state reaction, with the main objective of producing a biocement to evaluate the incorporation and release of the drug Indomethacin, which is an anti-inflammatory. β -TCP was characterized by X-ray Diffraction (XRD), Infrared Spectroscopy (IR), Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersion X-Ray Spectroscopy (SEM) and determination of particle size distribution (BET). The cytotoxicity test was also carried out following ISO 10993-5 and ISO 10993-12 standards. The biocement was characterized by XRD, MEV, Determination of hydrogenion potential (pH), apparent porosity, Pick Time and diametral compression resistance. After the incorporation and release of the drug Indomethacin in the biocement, the study of the release, the setting time, the resistance to diametral compression and the ANOVA statistical analysis of the results were carried out. The characterization carried out showed that the solid phase reaction of calcium hydroxide and calcium hydrogen phosphate allows the preparation of monophasic β -TCP, provided that the appropriate combination of the synthesis parameters is used. Therefore, the obtained material has no toxicity, is biocompatible and shows a strong candidate for biomedical applications.

Keywords: Biomaterials. Bioceramics. Biocement. Drug.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 –	Fosfato Tricálcico	24
Figura 2.2 –	Sequência de reações na interface do tecido ósseo com o biomaterial	27
Figura 2.3 –	Concentração de uma droga modelo no sangue com (a) dosagem tradicional da droga e (b) dosagem com liberação controlada	29
Figura 2.4 –	Estrutura molecular da indometacina	32
Figura 2.5 –	(a) Moinho de bola Planetário da marca Fritsch Pulverisette, modelo P-5. (b) Representação do movimento de esferas dentro do moinho.....	33
Figura 2.6 –	Poros abertos e poros fechados	41
Figura 2.7 –	Distribuição de tensão e secção transversal em uma amostra submetida a ensaio de compressão diametral	42
Figura 3.1 –	Fluxograma dos procedimentos experimentais	53
Figura 3.2 –	Aparelho de Vicat Adaptado	58
Figura 3.3 –	Curva de calibração da ampicilina	59
Figura 4.1 –	Difração de raios X da amostra antes da calcinação.....	62
Figura 4.2 –	Difração de raios X da amostra sintetizada a 1000 °C	63
Figura 4.3 –	Infravermelho da amostra calcinada a 1000 °C	64
Figura 4.4 –	Morfologia da amostra antes da calcinação	66
Figura 4.5 –	Morfologia da amostra de β -TCP com aumento de 2934x	66
Figura 4.6 –	Morfologia da amostra de β -TCP com aumento de 5.000x	67
Figura 4.7 –	Mapeamento dos grupos funcionais do β -TCP	68
Figura 4.8 –	Representativa do poço de controle com as células (NCTC Clone L929), em meio de cultura MEM. Aumento de 10x	69
Figura 4.9 –	Representativa do poço de células (NCTC clone L929) incubadas com a substância de β -TCP. Aumento de 10x	69

Figura 4.10 – Representativa do poço de controle com as células (NCTC Clone L929), em meio de cultura MEM	70
Figura 4.11 – Representativa do poço de células (NCTC clone L929), incubadas com a substância de referência Zdec	71
Figura 4.12 – Ensaio de resistência à compressão diametral dos biocimentos com adição de monetita	73
Figura 4.13 – Difração de raios X do biocimento	76
Figura 4.14 – Morfologia da amostra do Biocimento	77
Figura 4.15 – Perfil de liberação da Indometacina no biocimento	80
Figura 4.16 – Taxa de liberação da Indometacina no biocimento	81
Figura 4.17 – Modelo de Higuchi para as 24 horas de liberação de indometacina...	82
Figura 4.18 – Modelo de Korsmeyer - Peppas para as 24 horas de liberação de indometacina	83
Figura 4.19 – Ensaio de resistência à compressão diametral do biocimento sem e com adição do fármaco	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 –	Biomateriais e aplicações comuns	21
Tabela 2.2 –	Estruturas cristalinas e parâmetros de rede das diferentes fases do TCP	24
Tabela 2.3 –	Notações e organização dos dados para aplicação do método ANOVA	47
Tabela 2.4 –	Tabela de análise de variância (ANOVA)	50
Tabela 4.1 –	Análise quantitativa para razão molar de Ca/P do β – TCP	68
Tabela 4.2 –	Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral dos biocimentos com adição de monetita ...	73
Tabela 4.3 –	Análise de variância da resistência à compressão dos biocimentos com adições de monetita	74
Tabela 4.4 –	Teste de Tukey-Kramer correspondente à resistência à compressão dos biocimentos com adições de monetita	75
Tabela 4.5 –	Tempo inicial e final de pega do biocimento	79
Tabela 4.6 –	Tempo inicial e final de pega do biocimento com e sem adição do fármaco	84
Tabela 4.7 –	Análise de variância do tempo inicial de pega do biocimento com e sem adição do fármaco	84
Tabela 4.8 –	Análise de variância do tempo final de pega do biocimento com e sem adição do fármaco	85
Tabela 4.9 –	Teste de Tukey-Kramer do tempo final de pega do biocimento com e sem adição do fármaco	85
Tabela 4.10 –	Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral do biocimento sem e com adição do fármaco	86
Tabela 4.11 –	Análise de variância da resistência à compressão diametral do biocimento sem e com adição do fármaco	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Justificativa	18
1.2	Objetivos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Biomaterial	20
2.2	Biocerâmica	22
2.3	β -Fosfato Tricálcico (β -TCP)	23
2.4	Reação no estado sólido	25
2.5	Biocimentos de Fosfato Tricálcico	26
2.6	Liberação controlada de fármacos	28
2.6.1	<i>Biocimentos como veículos de liberação de fármacos</i>	30
2.7	Indometacina	32
2.8	Moagem de alta energia	33
2.9	Técnicas de Caracterização de biomateriais	35
2.9.1	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	35
2.9.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho (IV)</i>	36
2.9.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (MEV-EDS)</i>	37
2.9.4	<i>Determinação do Tamanho Médio de Partículas (BET)</i>	39
2.9.5	<i>Porosidade</i>	40
2.9.6	<i>Resistência à compressão diametral</i>	42
2.10	<i>Caracterização biológica</i>	43
2.10.1	<i>Citotoxicidade</i>	44
2.11	Análise de Variância (ANOVA)	45
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	Matéria-Prima	51
3.2	Procedimento experimental	51
3.2.1	<i>Síntese do β-Fosfato Tricálcico (β-TCP)</i>	51
3.2.2	<i>Preparação do biocimento</i>	51
3.2.3	<i>Biocimento incorporado com o fármaco (Indometacina)</i>	52
3.3	Caracterização do β -Fosfato Tricálcico (β -TCP)	54

3.3.1	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	54
3.3.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho (IV)</i>	54
3.3.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (MEV-EDS)</i>	54
3.3.4	<i>Determinação do Tamanho Médio de Partículas (BET)</i>	55
3.3.5	<i>Citotoxicidade in vitro</i>	55
3.4	Caracterização do biocimento	56
3.4.1	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	56
3.4.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	56
3.4.3	<i>Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)</i>	56
3.4.4	<i>Porosidade aparente</i>	57
3.4.5	<i>Tempo de pega</i>	57
3.4.6	<i>Resistência à compressão diametral</i>	58
3.5	Caracterização do biocimento com fármaco	58
3.5.1	<i>Tempo de pega</i>	58
3.5.2	<i>Resistência à compressão diametral</i>	58
3.5.3	<i>Estudo da liberação controlada de fármaco</i>	59
3.5.4	<i>Avaliação da cinética de liberação controlada do fármaco</i>	60
3.6	Análise Estatística	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1	Caracterização do β-TCP	62
4.1.1	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	62
4.1.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho (IV)</i>	64
4.1.3	<i>Determinação do Tamanho Médio de Partículas (BET)</i>	65
4.1.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (MEV-EDS)</i>	66
4.1.5	<i>Citotoxicidade in vitro</i>	68
4.2	Caracterização do biocimento	72
4.2.1	<i>Resistência à compressão diametral e análise estatística</i>	72
4.2.2	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	75
4.2.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	76
4.2.4	<i>Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)</i>	77

4.2.5	<i>Porosidade aparente</i>	78
4.2.6	<i>Tempo de pega</i>	79
4.3	Estudo da liberação controlada do biocimento com o fármaco	79
4.4	Caracterização e análise estatística do biocimento com e sem o fármaco	83
4.4.1	<i>Tempo de pega</i>	83
4.4.2	<i>Resistência à compressão diametral</i>	86
5	CONCLUSÕES	88
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	90
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Desde épocas passadas o homem tem-se preocupado em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo. Diversos materiais têm sido utilizados, porém todos provocam, em maior ou menor grau, uma resposta imunológica do receptor. Dentre os materiais biológicos, os enxertos de origem autógena (do mesmo indivíduo) são os que apresentam melhor previsibilidade por possuírem propriedades osteogênica, osteocondutora e osteoindutora. Entretanto, sua aplicação está limitada a cada caso particular, ao estado do paciente, à localização e ao tamanho do defeito. Com a finalidade de superar tais limitações, e também devido ao grande desenvolvimento científico e tecnológico, é cada vez mais crescente a utilização de biomateriais de origem sintética que possibilitam, em muitos casos, a diminuição ou a eliminação do uso de materiais de origem biológica (TAKYA *et al.*, 2011; BARBANTI *et al.*, 2011).

A utilização de biomateriais para implantes não é um conceito novo. Os biomateriais são utilizados desde o tempo em que o homem dava seus primeiros passos na medicina, mas só depois da Segunda Guerra Mundial houve um avanço significativo nesse ramo da Engenharia dos Materiais (BRAGA, 2015).

Os principais avanços dos biomateriais têm ocorrido principalmente devido ao aumento do número de pacientes em função do crescimento da população. O aumento da expectativa de vida acrescenta o número de pacientes nos hospitais em virtude da ocorrência de osteoporose (doença degenerativa de descalcificação e aumento da porosidade nos ossos) e de acidentes nos meios de transporte.

Um dos maiores desafios da ciência nos últimos anos tem sido o desenvolvimento de tecnologias para a produção de veículos (ou carreadores) que permitam a liberação controlada de fármacos no organismo humano, possibilitando a redução das doses dos medicamentos, tornando-os ao mesmo tempo mais eficazes. Uma das formas de fazer uso racional e efetivo dos fármacos é precisamente sua administração local e controlada. Isto se faz quando uma quantidade ideal de anti-inflamatório para 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, esses 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

anti-inflamatórios, o tratamento da infecção e o procedimento cirúrgico podem ser feitos simultaneamente (OLIVEIRA *et al.*, 2004; AZEVEDO, 2002; FARREL, 2002).

Existe enorme potencial de uso da tecnologia a ser desenvolvida, permitindo uma redução nos gastos operatórios no sentido de evitar novas intervenções cirúrgicas para troca do material implantado, além da redução de riscos durante a cirurgia e consequentemente menores traumas e melhoria da qualidade de vida do paciente. Tais implicações demonstram a relevância dos biomateriais de fosfato de cálcio para utilização no campo da saúde.

1.1 Justificativa

Dentre os biomateriais, os biocimentos produzidos a partir de biocerâmicas de fosfato de cálcio apresentam morfologia nanoestruturada, e, devido a essa característica possuem área superficial elevada, o que favorece a liberação dos íons de cálcio e fósforo para meio biológico, melhorando a velocidade de reabsorção e a formação da estrutura óssea (BOVERHOF *et al.*, 2015; BUSQUETS, 2017; PAUW *et al.*, 2017; RUNOWSKI e LIS, 2016). Desta forma, os biocimentos podem ser utilizados como dispositivos para liberar substâncias ativas no corpo humano, como os antibióticos e anti-inflamatórios. A Indometacina é um fármaco anti-inflamatório utilizado no tratamento de uma série de condições como artrite reumatóide, osteoartrite, artropatia do quadril, espondilite, tendinite, lombalgia etc (ROBERTS e MORROW, 2001). É de grande importância, nesses tratamentos, maximizar o acesso do fármaco a sítios ósseos específicos e controlar a liberação da substância, mantendo-se a dosagem indicada por todo o período do tratamento, sem provocar o aparecimento de efeitos colaterais nem a perda da eficiência. Neste trabalho, a Indometacina foi adicionada ao biocimento de fosfato de cálcio e em seguida foi realizada uma avaliação das propriedades químicas e mecânica do dispositivo como carreador desse fármaco.

1.2 Objetivos

Objetivo Geral

Obtenção e análise de biocimento de fosfato de cálcio biocompatível incorporado com indometacina. Em particular, foi utilizado um estudo da morfologia e liberação do fármaco no biocimento.

Objetivos Específicos

- a) Produzir β -fosfato tricálcico via reação em estado sólido.
- b) Formular a composição dos biocimentos.
- c) Avaliar as propriedades dos biocimentos para liberação do fármaco.
- d) Verificar a conexão entre a incorporação do fármaco e as propriedades estruturais dos biocimentos.
- e) Analisar a liberação controlada do fármaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomaterial

Conforme Williams (1999), o termo biomateriais refere-se a materiais naturais ou sintéticos destinados a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir funções. Os biomateriais também podem ser definidos como sendo substâncias de origens naturais ou sintéticas que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos (TAKYA *et al.*, 2011). Com base nesses conceitos, surgem diversas aplicações para materiais naturais e sintéticos, sendo utilizados em um amplo número de aplicações no corpo humano, tais como: suturas cirúrgicas, sistemas para liberação controlada de drogas, stents e dispositivos ortopédicos (BARBANTI *et al.*, 2011).

Inúmeros fatores são considerados antes que um material possa ser utilizado como enxerto ou implante. Como característica imprescindível, estes materiais devem ser biocompatíveis, ou seja, deve atender aos requisitos para os quais foram projetados, não estimulando ou provocando um mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias (VALLET-REGÍ, 1997).

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):

- Bioinertes são os biomateriais que não produzem resposta biológica adversa;
- Bioativos são aqueles que favorecem a ligação química entre o material implantado e o tecido hospedeiro;
- Biorreativos são os que ficam no limite entre os bioinertes e os bioativos; biorreabsorvíveis, quando são degradados após um período de tempo;
- Biotolerantes são parcialmente aceitos pelo organismo e levam a formação de uma cápsula fibrosa ao seu redor;
- Biofuncionais são os que atendem aos requisitos de funcionalidade dada as suas propriedades mecânicas, químicas, ópticas e elétricas;

- Bioartificiais são quando existe uma combinação de materiais sintéticos e células vivas visando à reconstituição tecidual.

Os biomateriais possuem aplicações nos mais diversos campos da medicina a Tabela 2.1 apresenta algumas dessas aplicações.

Tabela 2.1 – Biomateriais e aplicações comuns

APLICAÇÃO	TIPO DE MATERIAL
Sistema Osseo Juntas (cotovelo, joelho) Placas de fixação Cimentos Ósseos Tendões e ligamentos artificiais Extensão de contornos Implante dentário e fixação dos dentes	Titânio, ligas TI-Al-V, aço inoxidável, polietileno (PE) Aço inoxidável, ligas de Co-Cr Polimetilmetaacrilato Hidroxiapatita Teflon, Dracon Titânio, alumina, fosfato de cálcio
Sistema Cardiovascular Próteses de vasos sanguíneos Válvula cardíaca Cateteres	Dracon, teflon, poliuretano Tecido reprocessado, aço inoxidável, carbono Silicone, teflon, poliuretano
Órgãos Coração artificial Reparos de pele	Poliuretano Compósito silicone-colágeno
Sensores Lente intraocular Lente de contato Bandagem para córnea	Polimetilmetaacrilato, silicone, hidrogel Silicone-acrilato, hidrogel Colágeno, hidrogel

Fonte: Ratner *et al.*, (1996).

De acordo com Elliot (1994) tais aplicações, nada mais são do 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.

2.2 Biocerâmica

Biocerâmica é um termo que não era conhecido até os anos 70. Contudo muitas biocerâmicas não são materiais novos. Em 1972, um dentista brasileiro, Amadeo Bobbio, estudou fragmentos de uma mandíbula Maia com mais de 4000 anos, descoberta em 1931, verificou que alguns dentes tinham sido substituídos por um compósito de matriz cerâmica com 95 a 98% de carbonato e 2 a 5% de matéria orgânica composta por proteínas fibrosas. Em ortopedia, o uso de biocerâmica de forma controlada começou no século XIX com a utilização do gesso para preenchimento ósseo (CHEVALIER e GREMILLARD, 2009).

As biocerâmicas são divididas quanto a sua composição química em: cerâmicas a base de fosfato de cálcio, biovidros, cimentos ósseos a base de sais de cálcio (fosfato de cálcio, carbonato de cálcio e sulfato de cálcio), cerâmicas a base de alumina, a base de zircônia e a base de sílica (SANTOS e BARREIRA PINTO, 2011; VALLET e RUIZ-HERNÁNDEZ, 2011).

As bioerâmicas de fosfato de cálcio como enxertos ósseos, tem ganhado considerável atenção, por serem materiais biocompatíveis (CHAPPARD *et al.*, 2010), possuírem propriedades bioativas (AOKI, 1991; XINGDONG *et al.*, 1991) e apresentarem semelhança com a constituição do tecido ósseo (LEGEROS, 2002).

Dentre as biocerâmicas, as mais utilizadas para aplicações biomédicas são, a Hidroxiapatita (Hap) e o Fosfato Tricálcico (TCP) sob as formas alotrópicas α e β , pois têm como características serem atóxicas, reabsorvíveis e não inflamatórias, não causam resposta imunológica, irritação ou reação de corpo estranho (CHAPPARD *et al.*, 2010; SANTOS e BARREIRA PINTO, 2011). Além destas, a capacidade osteocondutora promovida pela microarquitetura porosa de sua matriz (FRENKEN *et al.*, 2010), bem como seu poder osteoindutor (LI e KAWASHITA, 2011; YUAN *et al.*, 2010) aliado ao bom desempenho na capacidade de carrear células osteogênicas (SHAYESTEH *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2013) levam ao seu grande uso no campo das reconstruções ósseas (WAKIMOTO *et al.*, 2011; SCHMITT *et al.*, 2012; LINDGREN *et al.*, 2012).

A agregação de Hap e β -TCP é classificada como biocerâmica de fosfato de cálcio bifásica, e tem mostrado melhor desempenho em tecidos vivos quando associados do que quando utilizados isoladamente (MATSUSHIMA *et al.*, 2009; FRENKEN *et al.*, 2010; MARDAS *et al.*, 2011; SCHMITT *et al.*, 2012).

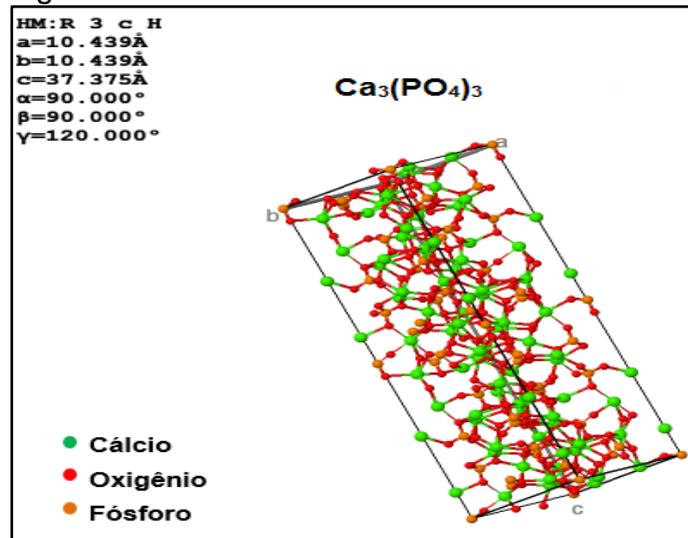
2.3 β -Fosfato Tricálcico (β -TCP)

O Fosfato Tricálcico (TCP), com fórmula química $(Ca_3(PO_4)_2)$ é um mineral da família dos fosfatos de cálcio e de grande importância na área de biomateriais, ele já é utilizado com sucesso no preenchimento de defeitos e extensão de contornos do tecido ósseo (BILLOTTE, 2000) bem como em sistemas de liberação controlada de fármacos (LAKES, 2000). Sua importância se deve, também, ao fato de este ser um dos precursores melhor sucedidos na síntese de Hidroxiapatita (Hap), além de ser empregado, em certos casos, em misturas bioativas de estímulo ao crescimento ósseo (KWON *et al.*, 2003).

Assim como ocorre com a hidroxiapatita, a deficiência de cálcio na estrutura do fosfato tricálcico é fortemente dependente das condições de síntese, principalmente de fatores como pH e temperatura. No caso do fosfato tricálcico, o ideal é que a razão Cálcio/Fosforo (Ca:P) seja de 1,5 (contra 1,67 da Hap). Em geral, o TCP apresenta maior taxa de degradação *in vivo* do que cristais de hidroxiapatita e assim como este último, apresenta boa capacidade osteocondutora. As propriedades mecânicas variam em função das modificações na estrutura do composto. Portanto, é esperado que ocorra uma variação nos resultados de ensaios mecânicos realizados por diferentes pesquisadores (PARK *et al.*, 2007; LAKES, 2000; KUMTA *et al.*, 2005).

A estrutura cristalina do fosfato tricálcico (FIGURA 2.1) é constituída de simetria romboédrica, grupo espacial R3c e célula unitária com as seguintes dimensões $a = b = 1,04$ nm e $c = 3,74$ nm, sendo sua aplicação, principalmente, como componente de cimentos biológicos, pastas de dentes, na substituição e regeneração de tecido ósseo ou como reforço de arcabouços poliméricos. (BOHNER, 2000; JINAWATH *et al.*, 2001). Isso se deve a bioatividade e biocompatibilidade do β -TCP. Além disso deve-se destacar a elevada taxa de reabsorção deste fosfato de cálcio pelo corpo humano (RATNER *et al.*, 1996; BILLOTTE, 2000).

Figura 2.1 – Fosfato Tricálcico



Fonte: Bases de dados – CAPES (2016).

O fosfato tricálcico pode apresentar três fases polimórficas. Apenas duas tem interesse prático como biomateriais, onde as temperaturas de transição e a sequência de ocorrência são: uma fase romboédrica, estável em temperaturas elevadas até 1180°C denominada de fase beta (β -TCP) e outra fase monoclinica estável em temperaturas entre 1180°C a 1430°C denominada de fase alfa (α -TCP) (BILLOTTE, 2000; ELLIOT, 1994; LAKES, 2000; RYU *et al.*, 2002). A estrutura cristalina e os parâmetros de rede de cada fase são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Estruturas cristalinas e parâmetros de rede das diferentes fases do TCP.

Fase	Parâmetros de rede	Sistema
Beta fosfato tricálcico (β -TCP)	a = b = 1,043 nm c = 3,737 nm	Romboédrico
Alfa fosfato tricálcico (α -TCP)	a = 1,287 nm b = 2,728 nm c = 1,521 nm	Monoclinico

Fonte: Guastaldi e Aparecida (2010).

As principais características do fosfato tricálcico incluem (GUASTALDI e APARECIDA, 2010):

- Possibilidade de substituições catiônicas: a forma alotrópica β -TCP possibilita que até cerca de 15% dos íons Ca^{+2} sejam trocados por Mg^{+2} sem mudanças

significativas em sua estrutura, originando o composto denominado de β -TCP substituído por magnésio;

- Bioatividade e osteocondutividade (habilidade de um biomaterial atuar como ligação direta ao tecido ósseo): as formas alotrópicas α e β -TCP exibem a mesma habilidade de osteocondução, porém a fase β -TCP apresenta maior bioatividade, sendo este fato atribuído ao arranjo estrutural desta fase que possibilita que maior quantidade de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} sejam trocados com o meio biológico;

- Biodegradação: a utilização do TCP juntamente com a Hap tem sido uma alternativa viável para aumentar a velocidade de reabsorção da Hap. Nestes casos, a velocidade de dissolução da mistura Hap/TCP é controlada pela quantidade de TCP utilizado.

O fosfato tricálcico e a hidroxiapatita são biocerâmicas, nas quais o comportamento é distinto em meio fisiológico, seguindo a sequência de solubilidade: α -TCP > β -TCP > Hap (HENCH E WILSON, 1993; ELLIOTT, 1994), a fase α -TCP apresenta uma maior resistência mecânica em relação as outras duas. Porém, segundo Elliot (1994), a presença desta fase não é favorável para o bom desempenho da cerâmica *in vivo*, sua aplicação apresenta restrições devido a dois aspectos: ocorrência de tensões provocadas por diferenças de densidade e elevada solubilidade em meio fisiológico, ocasionando sua rápida degradação.

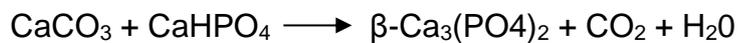
Dentre as fases dos biomateriais de fosfato de cálcio, a fase β -TCP é a mais promissora para implantes biocerâmicos, pois é a que apresenta melhor estabilidade química e resistência mecânica a este tipo de aplicação (GOUVEIA, 2008).

2.4 Reação no estado sólido

As biocerâmicas de fosfatos de cálcio podem ser sintetizadas por reações no estado sólido ou por métodos via úmida (síntese hidrotérmica, processo sol-gel, precipitação e neutralização) (HENCH e WILSON, 1993; LEGEROS, 1991). Alterações nestes métodos que podem ser considerados como clássicos (precipitação, hidrólise ou precipitação na presença de uréia, glicerina ou formaldeído) têm sido agregadas para preparar pós com morfologia, estequiometria, substituição iônica ou grau de cristalinidade como requerido para uma aplicação específica (VALLET-REGÍ, 2004).

A reação no estado sólido é um método tradicional de interdifusão de íons a partir de partículas sólidas gerando um produto, por um mecanismo fundamentado na

difusão e nucleação (HENCH e WILSON, 1993). Nos fosfatos de cálcio este processo envolve temperatura acima de 950°C para a mistura mecanicamente homogênea dos compostos de cálcio e fosfato (PETROV *et al.*, 2001). Apesar de ser um método simples na sua preparação, apresenta alguns inconvenientes como tamanho e morfologia de partícula não uniforme, falta de reprodutibilidade, caráter multifásico e perda de estequiometria, devido à volatilização de reagentes a altas temperaturas (HENCH e WILSON, 1993). Por este método, o β -fosfato tricálcico pode ser sintetizado pela interação no estado sólido de ortofosfato de cálcio acidificado (ZAVAGLIA, 2011), segundo a seguinte reação:



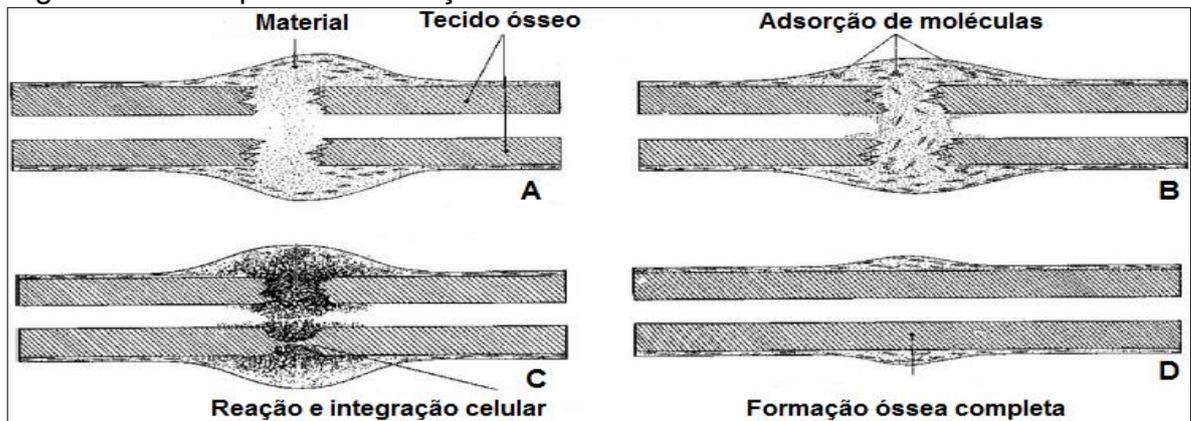
Não é possível formar o β -TCP por precipitação de soluções aquosas, estando sua obtenção associada à transformação de fase em estado sólido de hidroxiapatita deficiente em cálcio submetida a temperatura acima de 700°C (SENA, 2004).

2.5 Biocimentos de Fosfato Tricálcico

Os biocimentos de fosfato tricálcico são provenientes da composição entre cálcio/fosforo e vem sendo estudados desde a década 1980. Foram considerados um dos melhores biomateriais para a remodelação e reconstrução de defeitos ósseos. Essa preferência se deve, principalmente, por apresentarem boa propriedade de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, na facilidade de modelagem durante o processo cirúrgico e pela capacidade de regeneração e reconstituição óssea após o implante (CALIMAN, 2011).

A Figura 2.2 apresenta um esquema da bioatividade de um biocimento em um osso defeituoso.

Figura 2.2 – Sequência de reações na interface do tecido ósseo com o biomaterial



Fonte: Oréfice *et al* (2006).

A representação esquemática apresentada na Figura 2.2, em relação a bioatividade de um biocimento quando aplicado na reconstituição de um tecido ósseo ocorre da seguinte maneira: (A) preenchimento da cavidade defeituosa, (B) a adsorção das moléculas e a ligação interfacial do biomaterial com o tecido ósseo hospedeiro, (C) a interação de osseoindução e de osseointegração do biomaterial com o tecido ósseo hospedeiro resultando na neoformação óssea e (D) finalmente a formação do novo tecido ósseo e a sua cicatrização no tecido implantado (CAMARGO, 2003; ORÉFICE *et al.*, 2006).

Os biocimentos são utilizados na fixação de implantes, substituição de partes defeituosas do sistema ósseo, tratamento de diferentes tipos de doenças e como carga na liberação de fármacos (para uma variedade de remédios como drogas antibióticas, anticancerígenas e anti-inflamatórias que podem ser adicionados a estes biocimentos nos vazios decorrentes de sua microporosidade), oferecendo assim, uma série de benefícios tais como (DOS SANTOS, 2002):

- Não é necessário da forma ao preenchimento;
- A preparação do cimento ocorre apenas durante o ato cirúrgico;
- Excelente aderência entre osso e implante;
- O material é biocompatível e bioativo.

Assim, o biocimento pode resultar em um novo osso através da atividade celular dos osteoclastos e osteoblastos que são responsáveis pela remodelação do tecido ósseo, permitindo o crescimento do tecido ósseo ao longo de sua superfície. Por apresentarem estas características os biocimentos são altamente benéficos e vantajosos na área biomédica (KUMTA *et al.*, 2005; LEGEROS, 1991).

2.6 Liberação controlada de fármacos

Quando um medicamento é prescrito para um ser humano, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é desperdiçada, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o local de ação.

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 (ALBUQUERQUE, 2010).

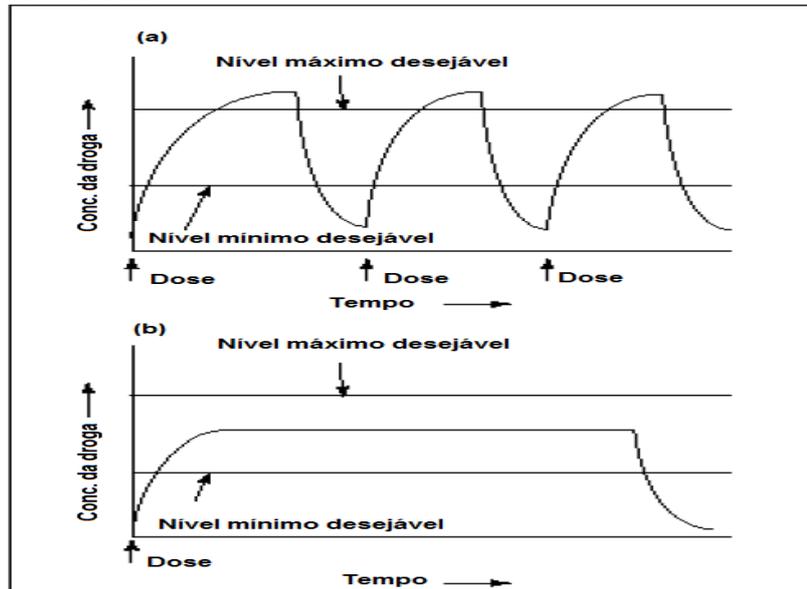
Os sistemas de liberação são descritos como “*drug delivery systems*”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (AZEVEDO, 2002).

- 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.

Nos formatos de spray, injeção e pílulas a concentração do fármaco aumenta na corrente sanguínea, atingindo um pico máximo e em seguida um declínio. Considerando que cada fármaco 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 hipotético 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, 2002). A diferença de concentração plasmática efetiva em função

do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser mais bem visualizada na Figura 2.3.

Figura 2.3 – Concentração de uma droga modelo no sangue com (a) dosagem tradicional da droga e (b) dosagem com liberação controlada



Fonte: Ansel, *et al.* (1999).

A liberação controlada de fármacos tem passado por um acelerado desenvolvimento entre 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; ANSEL *et al.*, 1999).

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.

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 sanguínea, 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).

Desta forma, a busca por formas diferenciadas e mais eficaz 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 existentes.

2.6.1 Biocimentos como veículos de liberação de fármacos

Uma das alternativas para o tratamento de enfermidades, como tumores ósseo, osteoporose e osteomielite, que habitualmente requer terapias longas e dolorosas é a utilização de biocimentos de fosfato de cálcio como veículo de liberação de fármacos. Entretanto, os estudos de incorporação de fármacos em biocimentos 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 as propriedades físico-químicas do biocimento, 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).

Diversos estudos são realizados desde os anos 90, utilizando biocimentos de fosfato de cálcio comerciais e também formulações desenvolvidas a nível experimental 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 tem sido realizado estudos com outros medicamentos, tais como: anti-inflamatórios, fármacos contra o câncer e hormônios (REGÍ *et al.*, 2006).

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 liberaçã ocorreu em 250 horas e seguiu a equaçã de Higuchi (ANEXO A).

Estudos realizados por Bohner e colaboradores (1997-b) mostram que a adiçã de 3% a 16% de sulfato de gentamicina em biocimento de brushita modificou suas propriedades reológicas e mecânicas, aumentando o tempo de pega, que era muito curto, e a resistêcia mecânica, devido à presença de íons sulfato no antibiótico. A liberaçã 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 liberaçã diminuiu com o aumento da concentraçã do antibiótico do cimento devido ao efeito do íon sulfato na microestrutura. A liberaçã total ocorreu em sete dias. Não foram verificadas diferenças significativas quanto à incorporaçã do fármaco na matriz, ou seja, em pó ou em soluçã (BOHNER *et al.*, 1997-b)

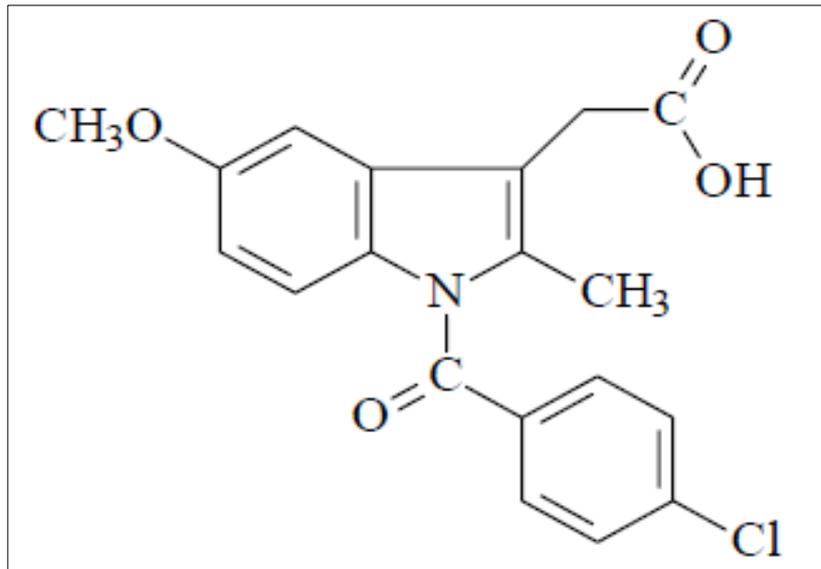
A adsorçã de vancomicina, ofloxacin e tetraciclina na superfície de biocimentos de brushita e Hidroxiapatita (Hap), e de monetita preparados com a técnica de impressã 3D, também tem sido alvo de estudos. Em tempo de incubaçã de uma hora foi verificado que a quantidade de antibiótico adsorvida é linearmente proporcional à sua concentraçã no líquido de incubaçã. A adsorçã do antibiótico segue a seguinte ordem: Hap > Monetita > Brushita. A uma concentraçã fixa do antibiótico, a quantidade adsorvida em relaçã ao tempo de incubaçã segue o modelo de Korsmeyer-Peppas (GBURECK *et al.*, 2007). A vancomicina e a ofloxacin são liberadas rapidamente da superfície do fosfato de cálcio em 1 e 2 dias enquanto a liberaçã 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 liberaçã dos antibióticos é exponencial em funçã do tempo e segue o modelo de Weibull (GBURECK *et al.*, 2007).

Pesquisadores estudaram o efeito da adiçã de sulfato de gentamicina em um biocimento de fosfato de cálcio não especificado. A presença de 0,15% de antibiótico não alterou o tempo de pega, a força de compressã nem a injetabilidade, mas 3,3% de antibiótico modificaram a resistêcia do biocimento. Segundo a liberaçã *in vitro* do antibiótico, o sistema é adequado para a prevençã e o tratamento da osteomielite (NACHINDO *et al.*, 1994).

2.7 Indometacina

Indometacina é um ácido indolacético metilado de nome químico, ácido [1-(4-clorobenzoil)-5-metóxi-2-metilindol-3-il]acético (FIGURA 2.4). Ela pode ser descrita como pó cristalino, inodoro, de coloração branco amarelada (REYNOLDS 1993; ROBERTS *et al.*, 2001).

Figura 2.4 – Estrutura molecular da indometacina.



Fonte: Roberts *et al.* (2001).

A indometacina pode ser descrita de duas formas, γ (gama) e α (alfa). A forma γ , também chamada de forma I, apresenta alto ponto de fusão (160-161,5°C), baixa solubilidade, é termodinamicamente mais estável e forma cristais a temperaturas mais baixas. A forma α (forma II) é termodinamicamente menos estável, sua forma cristalina ocorre a uma temperatura superior à da forma I. A constante de dissociação (pKa) da indometacina é 4,5 e o coeficiente de partição em diclorometano/tampão fosfato pH 7,0 é de 16,3 e em éter/tampão fosfato pH 7,1 é de 8,2 (O'BRIEN *et al.*, 1984).

A solubilidade da indometacina é maior em clorofórmio e etanol, as formas I e II apresentam diferentes solubilidades em tampão fosfato e ambas são praticamente insolúveis em água (REYNOLDS, 1993; ERMIS e YÜKSEL, 1999).

A indometacina compõe a classe dos Anti-Inflamatórios Não Esteroides (AINES). Por apresentar importantes propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antitérmicas foi introduzida no tratamento de artrite reumatóide, artrite reumatoide juvenil moderada a severa, osteoartrite, artropatia degenerativa do quadril, espondilite anquilosante, artrite gotosa aguda, distúrbios musculoesqueléticos agudos, como

bursite, tendinite, sinovite, tenossinovite, capsulite do ombro, entorses e distensões, lombalgia e edema após procedimentos cirúrgicos ortopédicos (ROBERTS e MORROW, 2001). A absorção do medicamento é máxima dentro de 0,5 a 2 horas após a ingestão da dose recomendada, sendo o tempo médio para início da ação de 30 minutos (REYNOLDS, 1993).

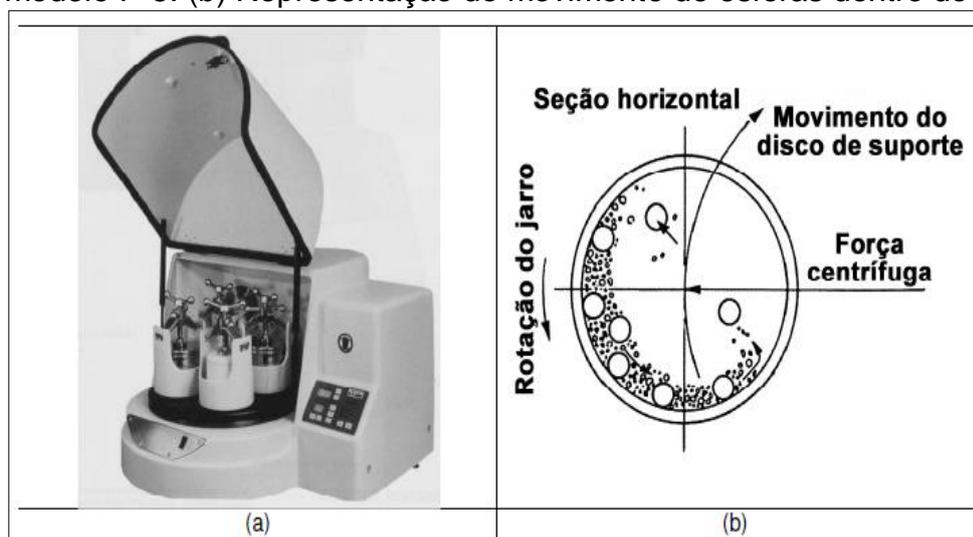
2.8 Moagem de alta energia

A moagem de alta energia é uma técnica de processamento de pós que permite a produção de materiais homogêneos partindo da mistura de pós-elementares (ZHANG, WANG e ZHU, 2003). Desenvolvida a partir da década de 1960, é utilizada para obter materiais nanoestruturados, reações no estado sólido, materiais amorfos, ligas metaestáveis e soluções sólidas supersaturadas. É um processo que envolve a otimização de um grande número de variáveis para atingir a fase e a microestrutura desejadas para o produto final (SURYANARAYANA, 2001).

Uns dos parâmetros mais importantes que têm efeito direto na construção do produto final são: tipo de moinho, recipiente, velocidade, tempo, relação entre a massa de bolas para massa do pó, e porcentagem de volume ocupado do recipiente.

O moinho planetário (FIGURA 2.5) é um dos tipos mais utilizado para moagem de alta energia, tendo capacidade de moer pequenas quantidades de pó a cada moagem.

Figura 2.5 – (a) Moinho de bola Planetário da marca Fritsch Pulverisette, modelo P-5. (b) Representação do movimento de esferas dentro do moinho.



Fonte: Suryanarayana (2001).

Os moinhos planetários receberam esse nome devido ao movimento do recipiente, ou jarras, que realiza o movimento de rotação em torno do seu próprio eixo e o movimento de translação em torno do eixo do moinho.

O material da jarra é um aspecto que deve ser dado importância, pois a parede do recipiente é submetida a um atrito constante e pode se desprender, incorporando na amostra. Isso pode contaminar o material ou alterar a composição química do pó.

Outro parâmetro importante é a velocidade escolhida, visto que, quanto maior a velocidade do moinho maior será a energia aplicada na moagem do pó. No entanto existe uma velocidade crítica para a realização da moagem, tendo o cuidado de não escolher uma velocidade tão alta que as esferas não mais exerçam impacto entre elas e o material, e sim fiquem grudadas na parede da jarra. Outro cuidado é com o aumento da temperatura provocado pelo aumento da velocidade, isso é um benefício quando se deseja promover difusão, homogeneização e ou formar ligas. Em outros casos, esse aumento de temperatura é indesejável, pois pode acelerar as transformações no processo e resultar na decomposição de soluções sólidas supersaturadas ou formação de fases metaestáveis durante a moagem.

O tempo de moagem é um dos parâmetros mais importantes a ser controlado. Normalmente o tempo de moagem é definido de modo a alcançar um estado estável entre fratura e a soldagem a frio nas partículas do pó. O tempo depende do tipo de moinho, da intensidade de moagem, da relação em massa de esferas para massa de pó e da temperatura de moagem. É importante ressaltar que para longos tempos de moagem, o teor de contaminação pode aumentar, e pode ocorrer a formação de fases indesejáveis, então é recomendável que o material seja moído em tempos curtos o suficiente para chegar ao estado final desejado (KUBASKI, 2010).

A razão entre as massas das bolas e a massa do material (conhecida pela sigla BPR – *Ball-to-powder weight ratio*) pode variar desde 1:1 até 220:1. Com o aumento da BPR, o número de bolas também aumenta assim como a quantidade de colisões entre as bolas, conseqüentemente a energia de colisão disponível será maior, tornando o processo mais rápido. Com mais energia disponível, mais calor é gerado e mais forte são as interações entre o meio de moagem e amostra. Esses fatores podem modificar a constituição do produto final (SURYANARAYANA, 2001).

No interior do recipiente de moagem, deve haver espaço suficiente para o movimento das esferas, tendo em vista que as interações entre as partículas do pó ocorrem quando as esferas exercem impacto sobre as partículas. Assim as esferas e as

partículas de pó devem movimentar-se livremente no interior do recipiente. Recomenda-se que aproximadamente 50% do espaço do recipiente de moagem sejam mantidos vazios. O maior efeito da atmosfera de moagem diz respeito à contaminação do produto final. Logo, é desejável que os pós sejam moídos em recipientes nos quais tenha sido realizado um vácuo prévio ou preenchidos com gases inertes (FAGAGNOLO, 2000).

2.9 Técnicas de caracterização de biomateriais

2.9.1 Difração de Raios X (DRX)

Por volta 1912, Max Von Laue, sugeriu que os cristais, por estarem organizados em forma de arranjos atômicos regulares, poderiam servir como redes de difração de raios X. Desde a sua descoberta a DRX, tem sido uma importante fonte de informação para a ciência e a indústria.

A análise de difração de raios X permite a identificação qualitativa e ou quantitativa de compostos cristalinos. Esse método, usando amostra policristalina fornece 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 DRX 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, alteração de intensidade e a variação entre maior ou menor fração de fases. O caráter nanométrico das partículas também é demonstrado através do alargamento dos picos.

Durante a análise a difração de raios X as seguintes informações sobre a amostra são obtidas:

- 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 proporciona uma visão mais específica das propriedades físico-química do β -fosfato tricálcico biológico ou sintético. As propriedades de vários fosfatos tricálcicos, tanto, biológicos como sintéticas, têm sido obtidas utilizando a DRX e a espectroscopia no infravermelho.

2.9.2 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do infravermelho é um método analítico que permite a identificação de grupamentos funcionais na superfície dos materiais. Esta técnica fundamenta-se nas vibrações moleculares, acompanhada por mudanças no momento bipolar na região de maior interesse para a espectroscopia que é de 400 e 4000 cm^{-1} (SANTOS, 2006).

A técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho é baseada na medida do comprimento de onda absorvido por uma molécula quando convertida em energia vibracional. Os diferentes modos de vibração da molécula dão origem ao espectro vibracional, cujas bandas são características dos grupos funcionais da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER e MORRIL, 1994; JEFFERY *et al.*, 1992).

Para que haja absorção da radiação infravermelha, é necessária que a energia de radiação coincida com a diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental da molécula e que a vibração origine uma modificação no momento dipolar elétrico da espécie envolvida (SILVERSTEIN; BASSLER e MORRIL, 1994). A absorção na região do infravermelho é causada por movimentos rotacionais e vibracionais dos grupos moleculares e ligações químicas de uma molécula. Essencialmente, existem duas vibrações fundamentais: estiramento, no qual os átomos permanecem no mesmo eixo da ligação, porém a distância entre os átomos aumenta e diminui, e deformação, pela qual as posições dos átomos mudam em relação ao eixo de ligação original. Quando

a radiação infravermelha de mesma frequência de vibração de estiramento, ou de deformação, incide na amostra a energia é absorvida e a amplitude de vibração é aumentada. Devido à energia de absorção na frequência de ressonância, o detector do espectrômetro de infravermelho grava um pico de absorção naquele comprimento de onda (SANTOS, 2006).

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

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica que sintetiza dados fundamentais para quem produz ou pesquisa materiais sólidos, desejando obter características da superfície do material. Na Ciência dos Materiais, esta técnica é apropriada para obter 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 (SENA, 2004). Para aumentar a potencialidade da técnica de MEV, principalmente quando se trata da caracterização de materiais opacos, costuma-se acoplar ao equipamento um detector que capta os raios X emitidos por átomos (EDS) da amostra.

O equipamento de MEV-EDS consiste em um sistema óptico-eletrônico formado por um canhão de elétrons, ou seja, 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 (TAN e SALTZMAN, 2004).

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 (SENA, 2004). 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. A energia que é transmitida aos elétrons 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 conseguem vencer a barreira de potencial que os prendem aos átomos do material, então são atraídos para um detector acoplado ao equipamento. Geralmente, a quase totalidade dos ES se origina das camadas mais externas dos átomos superficiais do material, porém, não são apenas os elétrons da superfície dos materiais analisados os responsáveis pela formação das imagens micrografias, existe também a contribuição de elétrons das camadas mais internas que podem se configurar ES. Este fato é raro de ocorrer, pois quanto mais distante da superfície, maior deverá 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 (SENA, 2004)

Através do subsídio 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 EDS tem a função de raios X característicos, correspondente a cada elemento químico componente de cada material analisado (CAMPOS, 2008). 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 EDS é uma

ferramenta essencial na obtenção de dados específicos sobre um material formado a partir de dois ou mais elementos (CAMPOS, 2008).

2.9.4 Determinação do Tamanho Médio de Partículas (BET)

Para a análise de área superficial específica de pós cerâmicos, metálicos ou poliméricos, geralmente é utilizado o método BET, nome dado em homenagem aos seus criadores, 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. A análise é realizada pelo fluxo de um gás inerte que passa rapidamente através da amostra. Em geral, o gás utilizado para o ensaio é o Nitrogênio (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).

Os procedimentos 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. Langmuir em 1918 propôs a primeira teoria que relaciona a quantidade de gás adsorvida com a pressão de equilíbrio do gás. 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, é fundamentada 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).

Tendo o volume ocupado pelas moléculas (V_m) 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, segundo a Equação (2.1) (RIBEIRO, 2003).

$$A_E = \frac{V_m \cdot N_A \cdot A_{ef}}{V_m} \quad (2.1)$$

Onde:

- N_A é o número de Avogadro $6,023 \times 10^{23}$ moléculas/mol;
- V_m 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, usando-se a Equação 2.2:

$$D = \frac{6}{\rho_T \cdot A_E} \quad (2.2)$$

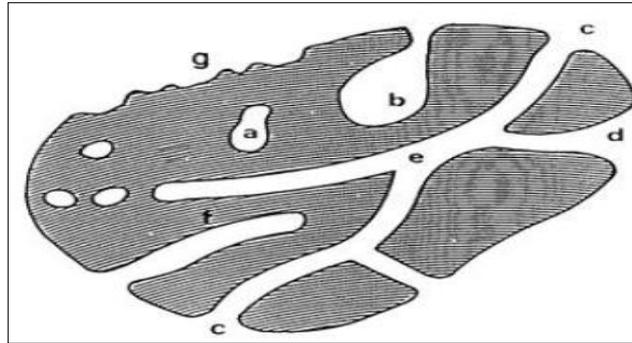
Onde:

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

2.9.5 Porosidade

Um material é considerado poroso quando contém canais, cavidades ou interstícios. Através da Figura 2.6, pode-se classificar os poros de acordo com a sua disposição para uma comunicação externa. Deste ponto de vista, uma primeira categoria de poros são aqueles totalmente isolados dos seus vizinhos, como na região (a), que são descritos como poros fechados. Eles influenciam as propriedades macroscópicas como: a densidade, resistência mecânica e condutividade térmica, mas são inativos em processos tais como o fluxo de fluido e adsorção de gases. Por outro lado, os poros que têm um canal de comunicação contínuo com a superfície externa do corpo, como (b) (c) (d) (e) e (f), são descritos como poros abertos. Alguns podem ser abertos apenas em uma extremidade (como b e f), descritos como poros cegos (ou seja, sem saída, ou escape). Outros podem ser abertos nas duas extremidades interconectados através de poros, tais como representados em (e). Os poros podem também ser classificadas de acordo com sua forma: podem ser cilíndricos: aberto (c) ou cegos (f), em forma de gota (b), contorno perfilado (d), ou em forma de fenda. Semelhante à porosidade é a rugosidade, representado em (g) na Figura 2.6 (IUPAC, 1994).

Figura 2.6 – Poros abertos e poros fechados.



Fonte: IUPAC (1994).

Poros conectados à superfície são mais prejudiciais à resistência mecânica, visto que muitas fraturas têm início em falhas estruturais superficiais, tais como poros. Poros fechados podem ser causados pelo fechamento de poros abertos, devido à evolução da sinterização, ou podem ser causados pela evolução de gases da fase sólida e estes gases não conseguem sair da estrutura. Estes últimos tendem a assumir forma esférica. No decorrer da sinterização, a porosidade, que no início era toda praticamente aberta, vai diminuindo de volume e certas conexões entre poros desaparecem, desta forma os poros vão se isolando e a conexão com o exterior tende a desaparecer. Os últimos poros da estrutura são fechados, ou seja, uma estrutura que não aparenta possuir poros na superfície pode possuir uma quantidade significativa de poros fechados (RICHERSON, 1992).

Segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1994), os poros também podem ser classificados de acordo com sua dimensão em microporos, para tamanhos menores que 2 nm; mesoporos, para tamanhos entre 2 e 50 nm; e macroporos, para maiores que 50 nm.

Na área dos biomateriais, as cerâmicas porosas servem como suportes para o crescimento de tecidos e cultura de células (RÖDEL *et al.*, 2008).

De acordo com Kuhne (1994), o tamanho de poros entre 100 μm e 200 μm permite a osteocondução em enxertos ou implantes porosos, no entanto o grau de interconectividade entre poros é mais importante.

O tamanho dos poros tem importância na viabilidade e a afinidade celular por influenciar no movimento, união e espalhamento celular, sinalização intracelular e transporte de nutrientes e metabólitos (OH *et al.*, 2007). A proliferação de osteoblastos, o crescimento vascular e a formação óssea, são favoráveis em implantes com poros interconectados com poros mínimos de 100 μm (HENCH, 1998).

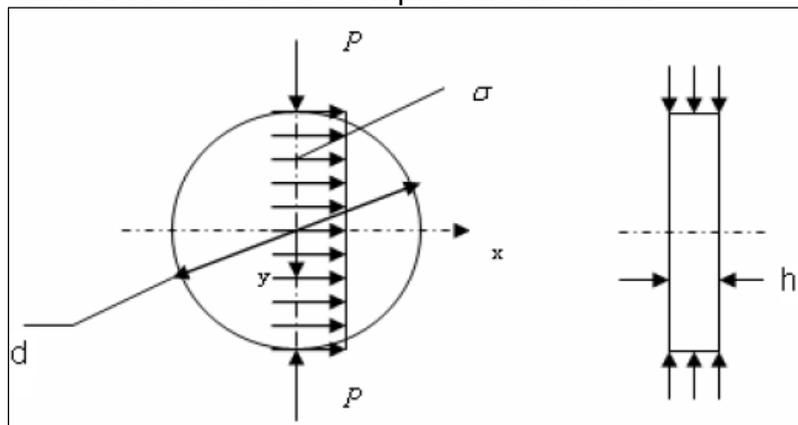
A geometria esférica, o tamanho e distribuição dos poros, interconectividade apresentam relação com as propriedades mecânicas, afetando a neovascularização *in vivo* (YANG *et al.*, 2002). O controle de porosidade nos blocos deve ser realizado de forma que não comprometa a propriedade mecânica da estrutura porosa (KARAGEORGOU e KAPLAN, 2005) e permitir sua manipulação e fixação na região a ser enxertada.

2.9.6 Resistência à compressão diametral

A resistência à compressão diametral, conhecido mundialmente como Brazilian Test, foi desenvolvido pelo brasileiro Fernando Lobo Carneiro Barboza em 1968 (GOMIDE, 2005). A compressão diametral é realizada com o objetivo de avaliar a tensão de tração máxima suportada por uma amostra, antes da ruptura (SANTANA, 2010; PIORINO NETO, 2000). Também chamado de método indireto, geralmente considera apenas o plano diametral da amostra testada, no qual ocorrem mais tensões. O ensaio consiste na aplicação de duas forças diametralmente opostas sobre um corpo de prova cilíndrico, produzindo uma tensão de tração normal ao plano de carregamento, como mostrado na Figura 2.7.

A facilidade para a realização do ensaio de compressão diametral e a simplicidade para obtenção de amostras densas com geometria cilíndrica pelo processo de prensagem axial tornam atrativa a avaliação da tensão de fratura por meio deste ensaio. Contudo, o formalismo matemático para calcular a tensão máxima de fratura requer certas aproximações devido à complexidade do perfil de tensões que atuam no corpo de prova durante o ensaio (PEITL FILHO, 1995).

Figura 2.7 - Distribuição de tensão e secção transversal em uma amostra submetida a ensaio de compressão diametral



Fonte: Stanley (2001).

Os cálculos de resistência à tração por compressão diametral são realizados segundo a norma da ABNT - NBR 7222/94 (GOMIDE, 2005), utilizando a Equação (2.3):

$$\sigma_{tc} = \frac{2P}{\pi \cdot h \cdot d}, \quad (2.3)$$

Onde,

- σ_{tc} é a tensão limite de resistência à tração (MPa)
- P é a carga de ruptura (N),
- d é o diâmetro da amostra (mm)
- h a altura do corpo de prova (mm).

Segundo Pittet e Lemaître (2000) a aplicabilidade do ensaio é:

- Normalmente utilizado para medir a resistência à tração de materiais frágeis como cerâmicas e biocerâmicas;
- A vantagem é que a fratura se inicia dentro da amostra, e o valor medido, portanto, não depende da superfície da amostra;
- O teste também pode ser usado para se fazer uma comparação entre diferentes composições de materiais frágeis.

2.10 Caracterização biológica

Um material biocompatível abrange tanto os efeitos que os materiais podem causar no organismo, como também, as ações do ambiente fisiológico sobre o biomaterial. Tanto os materiais naturais, quanto os sintéticos, apresentam características que definem, sua biocompatibilidade e bioestabilidade, as quais devem ser conhecidas para que se possa obter uma afirmação previa do comportamento do dispositivo durante o período de aplicação clínica (ABRAHAM *et al.*, 2004).

Segundo Cano *et al.* (2004), os ensaios biológicos para avaliação da biocompatibilidade dos materiais podem ser realizados através de uma grande variedade de testes *in vitro* e *in vivo*. Para os testes *in vitro*, são utilizados geralmente estudos em cultura de células e testes de bioatividade em líquido corporal simulado (SBF). As análises em cultura de células normalmente compreendem testes de citotoxicidade, medições bioquímicas de atividade celular, avaliação de proliferação, crescimento e morfologia celular. Testes estes que podem fornecer informações úteis a respeito da interação do material com o ambiente fisiológico e dos possíveis riscos associados à sua

aplicação, permitindo assim, identificar os materiais que não apresentam características adequadas à utilização em estudos clínicos.

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* necessitam ser realizados primeiramente para avaliar os materiais e identificar aqueles que apresentam comportamento citotóxico. Assim, é possível selecionar apenas os materiais mais adequados para a aplicação *in vivo*, diminuindo o número de animais experimentais.

A análise de compatibilidade *in vivo*, ou seja, com animais, é necessário para prever quando um dispositivo médico apresenta risco potencial para os pacientes. Com isto, os animais devem ser selecionados de acordo com a aplicação do dispositivo, considerando-se a anatomia e a bioquímica semelhante à situação de aplicação humana. Para mais, o protocolo de ensaio deve ser determinado segundo as leis que regem o uso de animais em laboratório, desta forma esses animais são tratados eticamente (RATNER *et al.*, 2004).

2.10.1 Citotoxicidade

Estudos sobre toxicidade *in vitro*, desde 1960, têm evidenciado que ensaios com culturas celulares são procedimentos rápidos, sensíveis, reprodutíveis e de baixo custo quando empregados para avaliação dos biomateriais (WILHELMUS, 2001; SCHMALZ, 1994). Segundo a ISO 10993-5 (1999), o teste de citotoxicidade *in vitro* é o início para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material de uso como biomaterial, apresentando alguns tipos de resultados preliminares relacionados à interação entre o material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente (PITHON *et al.*, 2008).

De acordo com a ISO 10993-5 (2009), os ensaios de citotoxicidade *in vitro* acontecem em três categorias: teste de extrato, teste de contato direto e teste de contato indireto. Os ensaios de extrato e de contato direto permitem uma análise qualitativa e quantitativa da citotoxicidade dos materiais ou da viabilidade das células quando em contato com os biomateriais. De outro modo, o teste de contato indireto admite somente a avaliação qualitativa da citotoxicidade.

A análise quantitativa da viabilidade celular pode ser realizada através de métodos colorimétricos usando corantes como o MTT, [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio] e o MTS, [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazólio] (NOZAKI *et al.*, 2012).

O corante MTT é um sal amarelo que é reduzido pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial que gera sal de formazan de cor púrpura. Esta redução só acontece nas células vivas (NOZAKI *et al.*, 2012). Assim, a viabilidade celular pode ser determinada pela intensidade da coloração púrpura que é proporcional à quantidade de cristais de formazan formados. O ponto negativo deste ensaio é a necessidade do uso de solventes orgânicos como o DMSO ou o isopropanol para dissolver os cristais de formazan que são insolúveis em água (NOZAKI *et al.*, 2012).

O MTS é reduzido igual ao MTT, pela enzima desidrogenase mitocondrial, com a formação de cristais de formazan. A diferença é que os cristais formados a partir do MTS são solúveis em água e, portanto, o uso de solventes orgânicos não é necessário. O MTS é utilizado em conjunto com um agente acoplador de elétrons, o PMS (fenazina metosulfato) (NOZAKI *et al.*, 2012).

2.11 Análise de Variância (ANOVA)

A análise de variância (ANOVA) é um método estatístico que consiste na comparação conjunta de várias médias de diferentes amostras. A ANOVA é aplicada para aceitar ou rejeitar, estatisticamente hipóteses pesquisadas em experimentações (BECKER, 2015).

O teste de significância compara uma estimativa do efeito de um tratamento ou amostra com a estimativa do erro aleatório. Considerando o erro aleatório desprezível, é possível através dessa comparação estabelecer se o efeito do tratamento analisado é ou não significativo. Para isso é utilizado um teste de hipótese estatístico, como por exemplo, o teste *F* das variâncias amostrais, que apresenta aceitação ou rejeição à hipótese em questão, a partir de valores experimentais adquiridos das amostras (FÁVERO *et al.*, 2014)

Os testes de hipóteses têm como base as curvas de distribuição de probabilidades. Desta forma, podem ocorrer dois tipos de erros, classificados como erro do tipo I e erro do tipo II. O erro do tipo I advém em aceitar a hipótese inicial H_0 sendo ela falsa. A probabilidade de se cometer um erro desse tipo pode ser controlado pela escolha de confiança estatística desejada na realização do teste de hipóteses. Portanto, 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 (ZIMMERMANN, 2004)

O erro do tipo II parte da rejeição de H_0 , quando essa é uma hipótese verdadeira. A probabilidade de se cometer esse erro 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 (KINAS e ANDRADE, 2010).

A legitimidade dos testes estatísticos de significância depende da existência de replicações, pois essas estimam o erro aleatório e tornam possível o uso de tabelas de significância, feitas através da consideração de que os erros são independentes.

A ANOVA considera 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. O erro é uma quantidade aleatória não previsível, cujo valor esperado é zero (BECKER, 2015).

A equação 2.4 apresenta o modelo matemático que descreve a origem da variação em cada uma das observações aleatórias de uma população dividida em k tratamentos.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij} \quad (2.4)$$

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.

Seja μ_j a média do tratamento j , o efeito do tratamento j (τ_j) será dado pela diferença entre a média do tratamento j e a média da população, de acordo com a eq. (2.5), e o erro aleatório na i -ésima observação do j -ésimo tratamento será obtido pela diferença entre o valor da observação e a média do tratamento ao qual pertence a observação em questão, conforme eq.(2.6).

$$\tau_j = \mu_j - \mu \quad (2.5)$$

$$\varepsilon_j = y_{ij} - \mu_j \quad (2.6)$$

A Tabela 2.3 mostra um resumo das notações e o formato utilizado para organização dos dados necessários à aplicação do método de análise de variância ANOVA.

Tabela 2.3 – Notações e organização dos dados para aplicação do método ANOVA

	Tratamentos					
	j = 1	j = 2	j = 3	...j	j = m-1	j = m
	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y _{1j}	Y _{1,m-1}	Y _{1m}
	Y ₂₁	Y ₂₂	Y ₂₃	Y _{2j}	Y _{2,m-1}	Y _{2m}

	Y _{r_{1,1}}	Y _{r_{2,2}}	Y _{r_{3,3}}	Y _{r_{j,j}}	Y _{r_{m-1,m-1}}	Y _{r_{m,m}}
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

Fonte: Garcia Diaz e Phillips, 1995.

Sendo as definições:

$$total\ geral = T = \sum_{j=1}^m T_j \quad (2.7)$$

$$número\ total\ de\ observações = N = \sum_{j=1}^m r_j \quad (2.8)$$

$$média\ total = \bar{Y} = \frac{T}{N} \quad (2.9)$$

O desvio total $Y_{ij} - \mu$ (eq.2.10) 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} .

$$Y_{ij} - \mu = \tau_j + \varepsilon_{ij} \quad (2.10)$$

Como não são conhecidos os parâmetros populacionais, usam-se os valores amostrais estimados de acordo com as definições apresentadas nas eq. (2.7), (2.8) e (2.9) para obtenção do desvio total, que dessa forma, será expresso por:

$$Y_{ij} - \bar{Y} = (\bar{Y}_j - \bar{Y}) + (Y_{ij} - \bar{Y}_j) \quad (2.11)$$

Para levar em consideração apenas a magnitude da variação independentemente do sinal algébrico, calculam-se os quadrados das diferenças, conforme eq. (2.12).

$$(Y_{ij} - \bar{Y})^2 = (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 + (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 + 2(\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) \quad (2.12)$$

Somando-se em i e j , tem-se

$$\begin{aligned} \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y})^2 &= \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 + \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 + \\ &+ \sum_j \sum_i 2(\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) \end{aligned} \quad (2.13)$$

Assim, são definidas as seguintes somas de quadrados:

$$SQ_{total} = \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y})^2 \quad (2.14)$$

$$SQ_{tratamento} = \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 \quad (2.15)$$

$$SQ_{erro} = \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 \quad (2.16)$$

Logo a equação fundamental da análise de variância poderá ser escrita como:

$$SQ_{total} = SQ_{tratamento} + SQ_{erro} \quad (2.17)$$

Dessa forma, são definidas 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.

$$QM_{total} = \frac{SQ_{total}}{N-1} \quad (2.18)$$

$$QM_{tratamento} = \frac{SQ_{tratamento}}{m-1} \quad (2.19)$$

$$QM_{erro} = \frac{SQ_{erro}}{N-m} \quad (2.20)$$

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 (\bar{Y}), que implica a perda de um grau de liberdade.

Do mesmo modo, os quadrados médios $QM_{tratamento}$ e QM_{erro} representam estimativas das variâncias entre tratamentos e dentro de cada tratamento, respectivamente, resultantes da divisão das somas de quadrados pelos respectivos números de graus de liberdade. Tendo como objetivo a comparação das variâncias entre os tratamentos, o quadrado médio que representa a variação dentro do tratamento ou amostra é chamado de erro experimental.

A quantidade de graus de liberdade entre tratamentos, ou entre amostras, é igual ao número de tratamentos menos um ($GL_{tratamentos} = m - 1$) e a quantidade de graus de liberdade dentro de cada tratamento, ou dentro de cada amostra, é igual a quantidade 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 $GL_{erro} = N - m$.

As variâncias entre os tratamentos são comparadas através dos valores de quadrados médios, admitindo-se uma hipótese inicial H_0 de que as médias dos tratamentos ou amostras são diferentes ($H_0 \neq \bar{Y}_1 \neq \bar{Y}_2 \neq \dots \neq \bar{Y}_m$). Quando 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 .

Tal 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. (2.21), na qual v_1 representa o grau de liberdade do quadrado médio 1 ($QM1$) e v_2 , o grau de liberdade do quadrado médio 2 ($QM2$).

$$F_{v_1, v_2} = \frac{QM_1}{QM_2} \quad (2.21)$$

O teste F de Snedecor consiste em comparar o valor de F calculado a partir dos resultados observados (eq. 2.22) 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. Os valores de F são tabelados 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 (HAIR *et al.*, 2009). Portanto, o valor de F tabelado é representado na forma F_{α, v_1, v_2} , sendo denominado de valor crítico de F .

$$F_{m-1, N-m} = \frac{QM_{tratamento}}{QM_{erro}} \quad (2.22)$$

Se o resultado de F assumir valor maior do que o tabelado, afirma-se uma confiança de $[(1 - \alpha) 100]\%$ que as médias são diferentes e portanto a hipótese será nula.

Os resultados da análise de variância geralmente se apresentam no formato apresentado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Tabela 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}		

Fonte: Adaptado de DOWNING; CLARK, 2000.

Os resultados calculados da análise de variância serão válidos, quando os dados apresentarem distribuição normal e quando as variâncias dentro das amostras sejam aproximadamente iguais. Para mais, as variáveis devem ser aleatórias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-Prima

Os precursores empregados para a síntese de β -TCP foram hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 96% - FLUKA®] e hidrogeno fosfato de cálcio [CaHPO_4 98% - DINÂMICA®]. Para auxiliar na formação do biocimento foi utilizado o fosfato de sódio bibásico [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (99%) - DINÂMICA®].

O medicamento escolhido para estudo de liberação foi a indometacina (ASPEN PHARMA - Lote: A846655).

3.2 Procedimento experimental

3.2.1 Síntese do β -Fosfato Tricálcico (β -TCP)

Para a síntese do β -TCP, os reagentes foram pesados segundo a estequiometria da Equação 3.1:



Em um almofariz de ágata, hidróxido de cálcio e hidrogeno fosfato de cálcio foram homogeneizados e, em seguida, calcinados em forno mufla a 1000 °C com taxa de aquecimento de 5 °C/min durante 1 hora, tempo suficiente para a ocorrência da reação. Após o tratamento térmico os pós de fosfato de cálcio foram caracterizados por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho (IV), Determinação do Tamanho Médio de Partículas (BET) e Citotoxicidade *in vitro*.

Após as caracterizações preliminares e confirmação da fase desejada, os precursores foram misturados, prensados e calcinados a fim de se obter corpos de prova para a caracterização de Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (MEV-EDS). Foram produzidos corpos de prova cilíndricos de 6 mm de altura e 12 mm de diâmetro, mediante aplicação de uma força de 1 T (tonelada) durante vinte segundos, em prensa uniaxial.

3.2.2 Preparação do biocimento

Antes da preparação do biocimento, o β -fosfato tricálcico e o hidrogeno fosfato de cálcio (utilizado como aditivo) foram homogeneizados num moinho de alta energia da

marca Fritsch modelo Pulverisette 6. A jarra utilizada na moagem foi de poliacetal (volume útil de 50mL) e as esferas de zircônia com 2,73 mm de diâmetro. A relação entre a massa das amostras e a massa das esferas foi de 1:10. O tempo de moagem foi de 4 horas, com pausa de 10 minutos após 30 minutos de moagem para evitar o superaquecimento do material. A velocidade de rotação foi de 350 rpm.

Depois da moagem, realizada no Laboratório de Magnetismo e Materiais Magnéticos do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Ceará, a mistura foi transferida para um béquer ao qual foi adicionado o líquido (solução a 2,5% de fosfato de sódio) para auxiliar na formação da pasta do biocimento e promover o tempo de pega (CAMARGO *et al.*, 2007).

A relação líquido/sólido (L/S) foi determinada empiricamente, visando-se à obtenção de uma pasta coesa para a moldagem dos corpos de prova. Após testes realizados com diferentes composições de L/S em mL/g (0.4, 0.43, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.7, 0.8), a que apresentou melhor coesão foi a de 0.43.

Após três minutos da preparação da pasta o material resultante foi transferido para moldes de polímero Teflon® em formato de cilindros com 6 mm de altura e 12 mm de diâmetro. Os corpos de prova foram desmoldados após 2 h e deixados em temperatura ambiente.

Com o intuito de aumentar a resistência mecânica dos biocimentos, prepararam-se novas formulações mediante a adição de 3%, 5%, 10%, 20% e 30% de hidrogeno fosfato de cálcio (monetita). Todas essas formulações foram submetidas a testes de compressão diametral. As amostras foram preparadas em lotes de 3 (cada) e ensaiadas após pega de 24 horas.

Os testes foram realizados em uma máquina universal de ensaios, marca Instron, modelo 4443, com velocidade de 1 mm/min, utilizando cilindros de 12 mm de diâmetro e 6 mm de altura. Em seguida o biocimento sintetizado com a maior resistência foi submetido às análises de: DRX, MEV, PH, porosidade aparente e tempo de pega.

3.2.3 Biocimento incorporado com o fármaco (Indometacina)

A incorporação da indometacina no biocimento foi realizada com a adição de 0,3% do peso total da amostra na pasta resultante da mistura líquido-sólido, com relação L/S de 0,55 mL/g. A amostra com 0,3% foi selecionada de acordo com a quantidade de grama contida em cada cápsula presente nas embalagens do lote: A846655, ASPEN

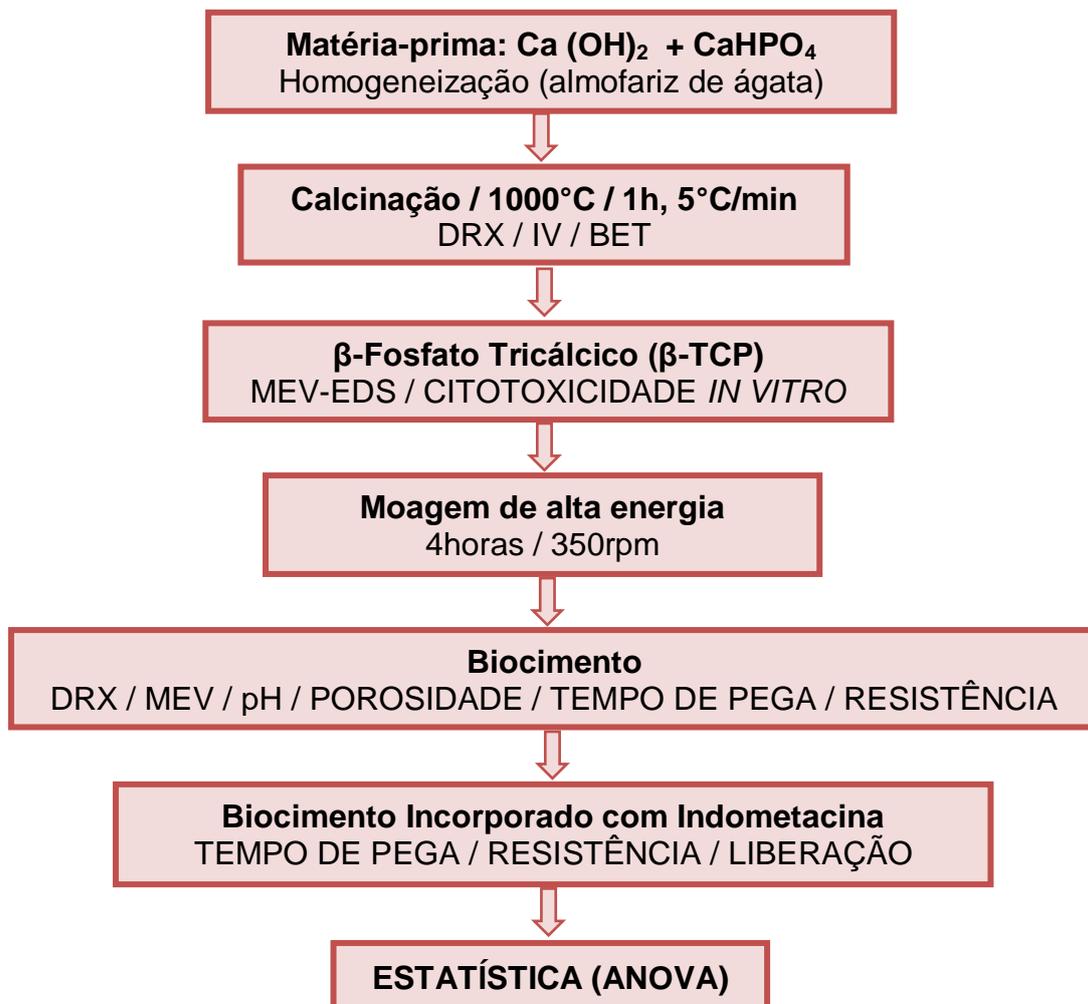
PHARMA. Em seguida, foi feita uma nova homogeneização. Após 3 minutos, a pasta foi transferida para os moldes onde ficaram 24 horas em temperatura ambiente para secar. Decorrido este tempo, a amostra com 0,3% de medicamento, produzida em triplicata foi desmoldada e acondicionada em frascos plásticos.

A preparação ocorreu no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Ceará.

Foram também realizadas as caracterizações de tempo de pega, resistência à compressão diametral e estudo da liberação do fármaco.

A Figura 3.1 mostra o fluxograma esquemático dos procedimentos experimentais realizados no desenvolvimento da pesquisa.

Figura 3.1 – Fluxograma dos procedimentos experimentais



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Caracterização do β -Fosfato Tricálcico (β -TCP)

3.3.1 Difração de Raios X (DRX)

A análise foi realizada no Laboratório de Raios-X do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará com o uso do difratômetro da marca *Panalytical* modelo *XPERT Pro MPD*, operando em 40kV x 40mA, equipado com um tubo de cobalto. A intensidade foi medida em função do ângulo de varredura 2θ , coletada no intervalo angular de 20° a 60° para os pós e de 5° a 60° para os biocimentos.

Os difratogramas obtidos foram comparados a padrões encontrados na literatura através do banco de dados JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*), com auxílio do programa *X'Pert HighScore Plus*. A amostra calcinada passou por um processo chamado de refinamento de estrutura Rietveld (RIETVELD, 1969), utilizando-se o programa DBWSTools (BLEICHER *et al.*, 2000).

3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Para a identificação de grupamentos funcionais do β -TCP foi utilizada a espectroscopia de infravermelho que é uma técnica fundamentada nas vibrações moleculares, acompanhada por mudanças no momento dipolar na região de maior interesse para a espectroscopia.

A espectroscopia de infravermelho do β -TCP foi realizada em um espectrômetro ABB, modelo FTLA2000 do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (MEV-EDS)

A análise microestrutural do β -TCP foi realizada em um microscópio de varredura FEG Quanta 450 ambiental com EDS/EBSD, estágio de resfriamento e aquecimento da Central Analítica na Universidade Federal do Ceará. A amostra foi fixada em um suporte com fita de carbono dupla-face e recoberta com carbono, utilizando um sistema de deposição a vácuo Bal-Tec.

A microscopia permitiu obter dados sobre a morfologia e tamanho das partículas formadas. A análise por EDS, teve como finalidade observar a relação molar Ca/P durante o processo de síntese do β -TCP.

3.3.4 Determinação do Tamanho Médio de partículas (BET)

A determinação da área superficial específica foi realizada pelo método de Brunauer, Emmet e Teller (BET), que consiste na adsorção física de um gás (comumente N₂). Através do método de adsorção gasosa, utilizando o equipamento Quantachrome Instruments modelo Autosorb-1C, com gás N₂ como adsorvedor, foi determinada a área superficial das partículas do β-TCP. Conhecendo o valor da área de superfície específica foi possível estimar o tamanho médio das partículas utilizando a Equação 3.2:

$$DET_{BET} = \frac{6}{\rho_T \cdot AE_{BET}} \quad (3.2)$$

Onde, DET_{BET} é o diâmetro médio das partículas (nm), ρ_T é a densidade teórica do material e AE_{BET} a área superficial (m²/g).

A análise do β-TCP foi realizada no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

3.3.5 Citotoxicidade *in vitro*

A análise de citotoxicidade *in vitro* foi realizada no Laboratório Biotechcell®, de acordo com a norma ISO 10993-5, 2009. A amostra de referência Zdec (*Zinc Diethyldithiocarbamate*) e o fosfato tricálcico foram extraídos em meio de cultura durante 24 horas a 37°C com 5% de CO₂, conforme a norma ISO 10993-12, 2012. O extrato foi testado a uma concentração máxima de 100% e as demais, em diluição seriada, de: 50%, 25%, 12,50%, 6,25%, 3,12% e 1,56%.

As células (linhagem NCTC clone L929) foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 10⁴ células/100µL e cultivadas em meio de cultura MEM (Meio Mínimo de Eagle) suplementado com 10% de soro e 1% de solução composta dos antibióticos penicilina (100U/mL) / estreptomicina (100µg/mL). As placas de 96 poços foram incubadas (37°C) em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas a fim de permitir a sedimentação e adesão celular.

Após esse período, a amostra de fosfato tricálcico, bem como a substância de referência foram adicionadas às culturas celulares. Após a exposição de 24 horas, o meio foi retirado e adicionado a cada poço 50µL de solução com o corante MTT [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio] (1mg/mL). As placas foram incubadas (37°C) em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂ por 2 horas e logo após a solução de

MTT foi removida e o precipitado de sal reduzido (Formazan) ressuspendido em 100 μ L de álcool isopropílico. Para a quantificação do Formazan, as absorvâncias de cada poço foram obtidas com o auxílio do espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm.

3.4 Caracterização do biocimento

3.4.1 Difração de Raios X (DRX)

A análise foi realizada no Laboratório de Raios-X do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará com o uso do difratômetro da marca *Panalytical* modelo *XPERT Pro MPD*, operando em 40kV x 40mA, equipado com um tubo de cobalto. A intensidade foi medida em função do ângulo de varredura 2θ , coletada no intervalo angular de 20° a 60° para os pós e de 5° a 60° para os biocimentos.

A identificação de fases presentes no biocimento foi realizada com o uso do programa *X'Pert High Score Plus*.

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise microestrutural do biocimento foi realizada em um microscópio de varredura FEG Quanta 450 ambiental com EDS/EBSD, estágio de resfriamento e aquecimento da Central Analítica na Universidade Federal do Ceará. A amostra foi fixada em um suporte com fita de carbono dupla-face e recoberta com carbono, utilizando um sistema de deposição a vácuo Bal-Tec.

A microscopia permitiu obter dados sobre a morfologia e tamanho das partículas formadas.

3.4.3 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

Para a determinação do pH foram preparados 3 corpos de prova do biocimento moldados no polímero Teflon[®] de formato de cilindros com 6mm de altura e 12mm de diâmetro. As amostras foram submersas em um becker contendo água deionizada à temperatura constante de 37° C. Os corpos foram mantidos submersos 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.

3.4.4 Porosidade aparente

A medida de porosidade aparente do biocimento foi realizada através do método de Arquimedes. Este método é fundamentado em medidas de massa da amostra quando seca e após permanecer imersa em água durante 24 horas.

Para o cálculo de porosidade aparente (*PA*) foi utilizada a Equação 3.3:

$$PA(\%) = \frac{M_u - M_s}{M_u - M_i} \times 100 \quad (3.3)$$

Onde, M_s é a massa seca da amostra (g), M_u é a massa da amostra úmida e M_i é a massa da amostra imersa em água.

A medida da porosidade foi realizada no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Ceará.

3.4.5 Tempo de pega

Os tempos de pega inicial e final do biocimento foram determinados em um aparelho de Vicat modificado, com base na norma NBR 12128 (Figura 3.2). Nesta análise, a mistura recém homogeneizada foi inserida em um recipiente com uma placa na base do aparelho de Vicat modificado, situado sob o tronco cônico. Em seguida foi anotado o tempo, contado a partir do instante em que o líquido e o pó entra em contato. O tronco cônico foi abaixado suavemente até a superfície da pasta no molde. Posteriormente, foi solto em intervalos de tempo crescentes. No momento em que sua ponta ativa não mais adentrava totalmente na pasta, foi anotado o tempo inicial de pega. A determinação do tempo de fim de pega foi identificada na face oposta do corpo de prova, que estava originalmente em contato com a placa base. O tempo final do processo foi considerado como aquele em que o tronco cônico deixou somente marcas ligeiramente perceptíveis na superfície da amostra.

A análise foi realizada no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Ceará.

Figura 3.2 – Aparelho de Vicat Adaptado.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.6 Resistência à compressão diametral

A resistência mecânica do biocimento sem adição e com adição de hidrogeno fosfato de cálcio foi determinada pelos ensaios de resistência à compressão diametral. As amostras foram preparadas em lotes de 3 (cada) e ensaiadas após pega de 24 horas. Os testes foram realizados em um equipamento universal, marca Instron, modelo 4443, com velocidade de 1 mm/min, utilizando cilindros de 12 mm de diâmetro e 6 mm de altura.

A análise foi realizada no Laboratório de Ensaios Mecânico do Departamento de Odontologia na Universidade Federal do Ceará.

3.5 Caracterização do biocimento incorporado com o fármaco

3.5.1 Tempo de Pega

Os tempos de pega inicial e final do biocimento incorporado com fármaco foram determinados em um aparelho de Vicat modificado, com base na norma NBR 12128 (Figura 3.2). Realizado da mesma maneira descrita no tópico 3.4.5.

3.5.2 Resistência à compressão diametral

A resistência diametral do biocimento incorporado com a indometacina foi determinada pelos ensaios de resistência à compressão diametral. As amostras foram preparadas em lotes de 3 (cada) e serão ensaiadas após pega de 24 horas. Os testes

foram realizados em um equipamento universal, marca Instron, modelo 4443, com velocidade de 1 mm/min, utilizando cilindros de 12 mm de diâmetro e 6 mm de altura.

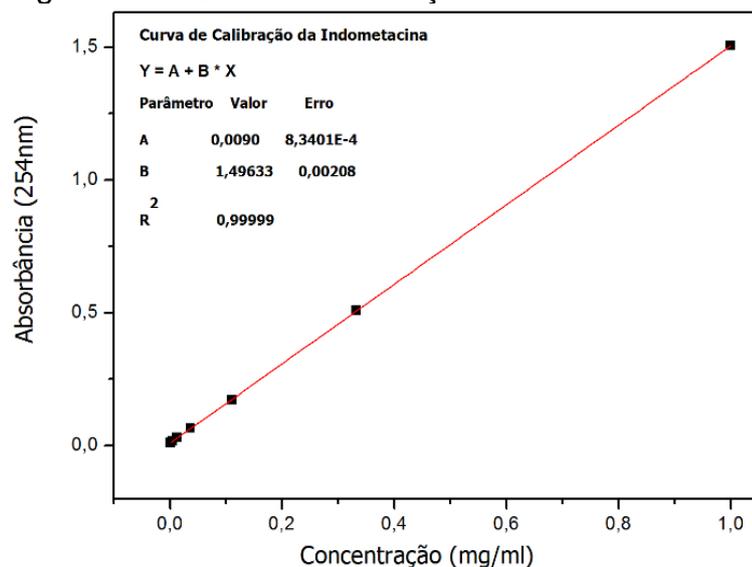
A análise foi realizada no Laboratório de Ensaios Mecânico do Departamento de Odontologia na Universidade Federal do Ceará.

3.5.3 Estudo da liberação controlada do fármaco

O estudo da liberação de Indometacina foi realizado *in vitro* no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Ceará.

A amostra obtida com a incorporação da indometacina foi presa em um fio de platina e submersa 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 indometacina liberada foi medida a absorbância, utilizando uma cubeta de quartzo e comprimento de onda de 254 nm, em um espectrofotômetro de UV-Visível Termo Scientific modelo Biomate 3. Foi plotada uma curva de calibração (Figura 3.3) que possibilitou a quantificação da concentração do fármaco realizada durante as medidas.

Figura 3.3 – Curva de calibração da Indometacina.



Fonte: Elaborada pela autora.

Como foram efetuadas diluições subsequentes da solução tampão em que foi liberada a indometacina, fez-se necessário corrigir a quantidade de massa obtida pelas leituras no espectrofotômetro usando a equação 3.4 (OGAWA e PLEPIS, 2002).

$$M_n = m_n - (m_{n-1} \times 0,99) + M_{n-1} \quad (3.4)$$

Onde,

- M_n = massa do fármaco, corrigida, presente na solução no momento da retirada da alíquota;
- m_n = massa do fármaco a ser corrigida, considerando-se a diluição devido à reposição com tampão;
- m_{n-1} = massa do fármaco a ser corrigida, considerando-se a diluição devido à reposição com tampão obtida na leitura anterior;
- M_{n-1} = massa do fármaco, corrigida, obtida na leitura anterior.

3.5.4 Avaliação Cinética de liberação controlada do fármaco

Os resultados encontrados nos perfis de liberação controlada foram submetidos a tratamentos matemáticos para a determinação de cinética de liberação, para isto foram aplicados dois modelos matemáticos, os quais descrevem a liberação do fármaco incorporado na matriz: Modelo de Higuchi e o Modelo de Korsmeyer – Peppas (ANEXO A). Para esses tipos de operações, as equações que descrevem o modelo de liberação dependem da geometria da amostra e da superfície exposta (CARRODEGUAS, 2000).

3.6 Análise Estatística

Os dados obtidos nos ensaios de tempo de pega e resistência à compressão, foram submetidos a tratamento estatístico em duas etapas. A primeira foi análise descritiva dos resultados, com a construção de gráficos que permitiram visualizar as principais tendências (Fit linear) observadas e a segunda 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 foram estatisticamente significantes e o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer, para determinar quais dentre as médias aritméticas foram significativamente diferentes (VIEIRA, 2006). Caso a diferença absoluta nas médias aritméticas das

amostras tenha sido maior do que o intervalo crítico, o par específico foi considerado significativamente diferente (LEVINE *et al.*, 2008).

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

De acordo com a revisão da literatura a respeito das propriedades dos biocimentos, foi observado que certas variáveis são fundamentais na determinação do procedimento experimental adotado. Desta forma, as análises selecionadas foram:

- Resistência à compressão diametral do biocimento com adições de fosfato de cálcio;
- Tempo de pega do biocimento com e sem o fármaco;
- Resistência à compressão diametral do biocimento com e sem o fármaco.

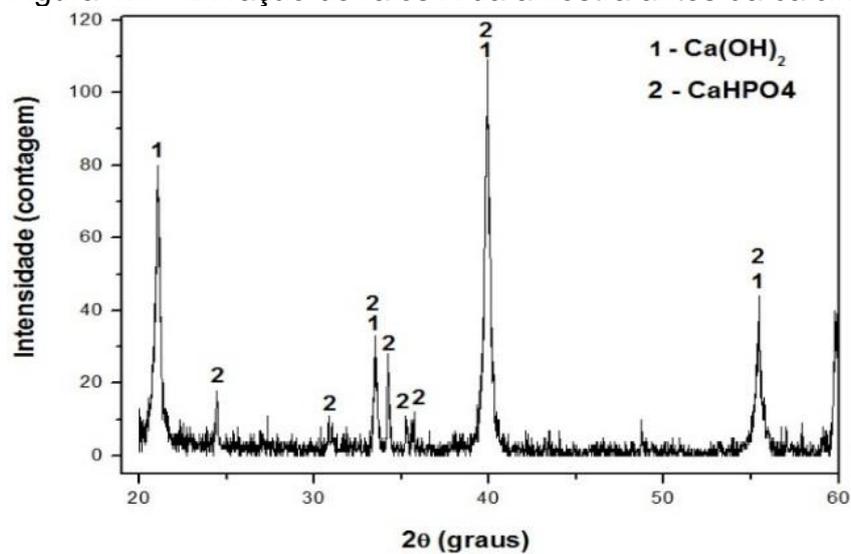
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do β -TCP

4.1.1 Difração de Raios X (DRX)

Antes do processo de síntese, os precursores químicos foram misturados, homogeneizados e caracterizados por difração de raios X, a fim de se verificar a pureza dos reagentes e ausência de contaminantes (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Difração de raios X da amostra antes da calcinação.

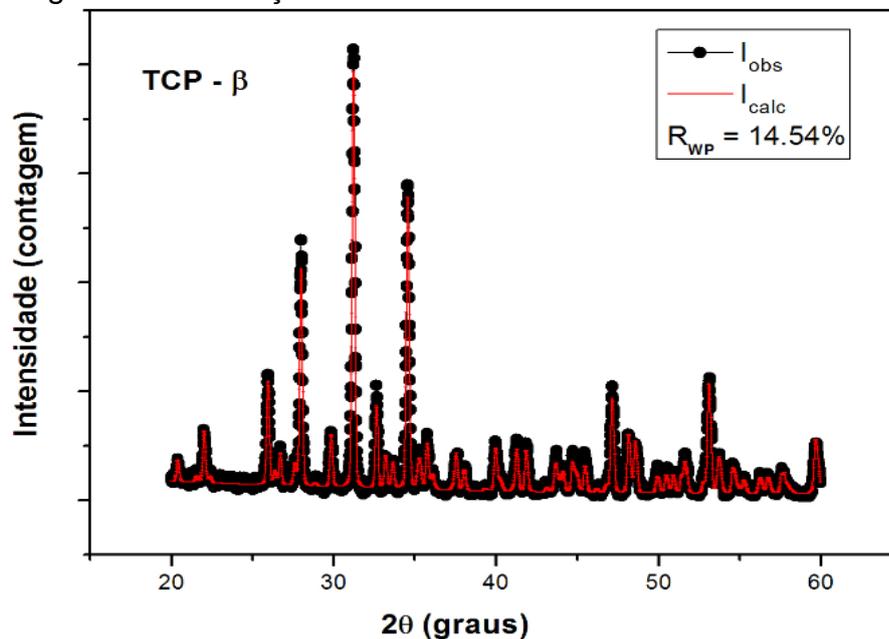


Fonte: Elaborada pela autora

Uma vez constatada a pureza desses compostos, procedeu-se a síntese, de acordo com a Equação 3.1, em estado sólido. Em geral, os processos usuais de precipitação química, para síntese de hidroxiapatita e do β -fosfato tricálcico, envolvem a preparação de uma solução homogênea de sais, contendo um dos íons de interesse, e a sua mistura com um agente precipitante (contendo o outro íon), resultando em um precipitado que é separado por filtração. Contudo, nem sempre esse precipitado é o material desejado, mas um intermediário que somente se converte ao produto esperado, após tratamento térmico (HAYEK e NEWESLEY, 1963; AZEVEDO e STRECKER, 2014). Na rota de precipitação química, é preciso ainda um controle rigoroso dos parâmetros do processo (temperatura, pH, tempo de reação etc), de tal modo que qualquer alteração pode levar a modificações da composição do produto final, revelando fases de outros fosfatos, principalmente para o β -TCP (BATISTA e SANTOS-FILHO, 2016).

Seguindo uma análise comparativa, o mecanismo de síntese adotado neste trabalho apresentou vantagens em relação à técnica anteriormente descrita. Evidentemente, foram realizados alguns testes até a combinação ideal entre tempo, temperatura e taxa de aquecimento, mas, uma vez determinadas as condições adequadas, não houve mais necessidade de controle desses parâmetros. Além disso, obteve-se diretamente o produto desejado (β -TCP), sem a presença de fases concomitantes, conforme pode ser observado no difratograma da Figura 4.2:

Figura 4.2 – Difração de raios X da amostra calcinada a 1000 °C.



Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 4.2 apresenta o padrão de difração observado (I_{obs}), o padrão calculado (I_{calc}) e o parâmetro R-WP determinado após refinamento Rietveld. Nesse tipo de refinamento, há alguns dados quantitativos que refletem seu progresso. Destes, o parâmetro R-WP é o fator estatisticamente mais significativo, tendo em vista que sua expressão analítica envolve o método dos mínimos quadrados entre as intensidades calculadas e as intensidades observadas (DUARTE, 2009). Os resultados de R-WP são considerados bons na faixa de 2 a 10%, enquanto os valores típicos variam entre 10 e 20% (DUARTE, 2009). Neste estudo, o valor obtido (14,54%) mostrou-se satisfatório.

Outros autores também utilizaram a caracterização por DRX para comprovar a obtenção do fosfato tricálcico. OPRITA e outros pesquisadores (2006), utilizando di-hidrogenofosfato de amônia ($NH_4H_2PO_4$) e carbonato de cálcio ($CaCO_3$) com razão molar 2:3 e temperatura de calcinação de 1100 °C, obtiveram β -TCP por decomposição, sendo

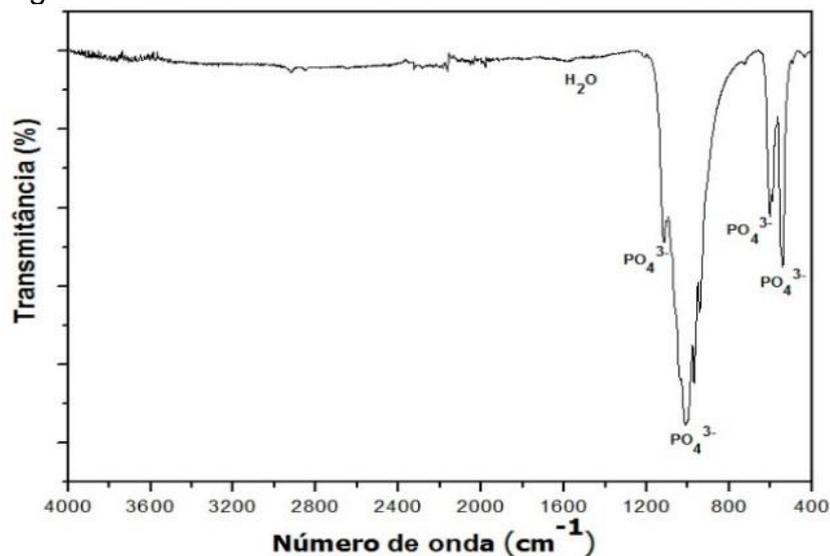
o material posteriormente caracterizado por DRX. ZOU e seus colaboradores (2005), por sua vez, sintetizaram β -TCP por precipitação em solução aquosa, seguida de calcinação a 900°C, durante 3 horas. A análise DRX revelou a presença da fase cristalina β -TCP segundo a ficha padrão (JCPDS 70-2065). Neste estudo, os picos característicos do β -TCP também foram identificados de acordo com a ficha JCPDS 70-2065, com auxílio do programa *X'Pert HighScore Plus*.

O padrão de difração permitiu, ainda, tecer algumas considerações com relação à cristalinidade do material sintetizado. A cristalinidade pode ser avaliada qualitativamente pelos picos de difração. Amostras como a caracterizada, que apresentam picos acentuados e agudos, têm maior cristalinidade, ao passo que amostras contendo picos de difração largos e de baixa intensidade, são consideradas pouco cristalinas (ARAUJO, 2006; DUARTE, 2014). Efetivamente, o grau de cristalinidade foi calculado, aplicando-se a técnica descrita no trabalho de LANDI *et al.*, 2000, e resultou no valor aproximado de 74,3%. Como a amostra não chegou a ser sinterizada, o valor calculado está de acordo com o esperado.

4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A análise de espectroscopia de infravermelho foi realizada com o objetivo de complementar as informações obtidas pela DRX. A Figura 4.3 apresenta, na região de 4000 – 400 cm^{-1} , as bandas mais significativas referentes ao fosfato de cálcio sintetizado.

Figura 4.3 – Infravermelho da amostra calcinada a 1000 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro é semelhante ao descrito na literatura para os fosfatos de cálcio. Segundo Reynaud *et al.* (2002) as bandas, 460, 550–600, 960, 1020 – 1120 cm^{-1} , são características dos grupos de fosfato e correspondem à deformação assimétrica do O-P-O em PO_4^{2-} . Não foram encontradas as bandas em 630 e 3540 cm^{-1} , atribuídas às hidroxilas (OH), que poderiam indicar a presença de hidroxiapatita. Na amostra de β -TCP a ausência de bandas em 460 e 740 cm^{-1} e de uma banda isolada entre 600 cm^{-1} , característica do α -TCP, indica que o material sintetizado refere-se ao β -TCP. Este fosfato de cálcio é facilmente identificado por apresentar uma banda de 900 – 1200 cm^{-1} . Observa-se a presença do pico 723 cm^{-1} , característico do modo simétrico $\nu(\text{P-O-P})$ atribuído a harmônicos de deformação. As bandas vibracionais visualizadas próximas às bandas 960 – 1120 cm^{-1} correspondem ao estiramento assimétrico do P-O do grupo PO_3^{2-} (BUI, 2011; KUNDU *et al.*, 2010).

Além disso, foi identificado outro grupo funcional na região entre 3700 e 2600 cm^{-1} que está associado à água fisicamente adsorvida. O grupo funcional relativo ao CO, da região entre 2300 – 2000 cm^{-1} , também está presente na amostra, indicando a presença de moléculas de CO_2 , que podem ter se originado do ambiente atmosférico e/ou estar adsorvidas na superfície do material (KUNDU *et al.*, 2010; WANG e NANCOLLAS, 2008). Não foi possível identificar os picos fracos entre 750 – 1000 cm^{-1} que poderiam ser atribuídos à substituição de carbonatos, de acordo com Wang *et al.* (2006).

4.1.3 Determinação do Tamanho Médio de Partículas (BET)

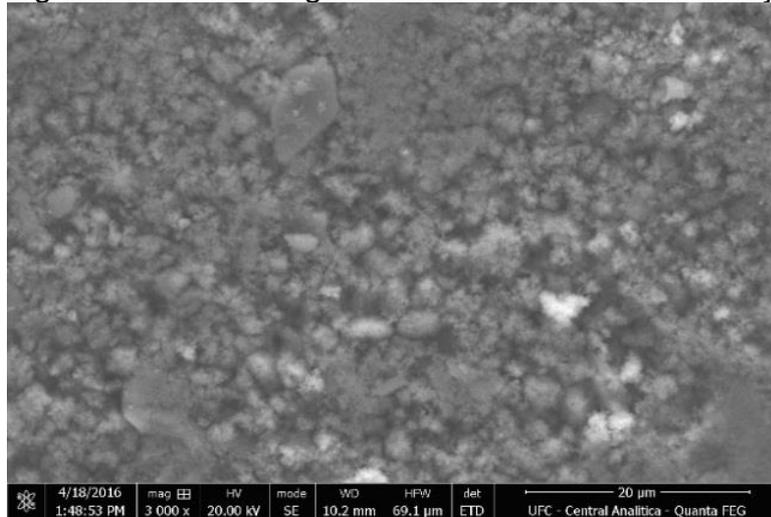
A área superficial específica calculada, via análise BET, foi de 24,17 m^2/g . Este dado, quando inserido na Equação 3.2, forneceu o valor aproximado de 81 nm para o diâmetro das partículas. Segundo a literatura, materiais que apresentam diâmetro entre 1 e 100 nanômetros são classificadas como nanométricos (REHMAN *et al.*, 2016; BOVERHOF *et al.*, 2015; BUSQUETS, 2017; PAUW *et al.*, 2017; RUNOWSKI e LIS, 2016).

É relevante salientar que diferentes métodos de síntese vêm sendo utilizados na produção de pós de fosfatos de cálcio, na tentativa de se obter partículas com tamanhos nanométricos e área superficial elevada, já que estas características são importantes para os estudos de reparação e reconstituição do tecido ósseo.

4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (MEV-EDS)

As Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 apresentam as imagens obtidas por MEV das amostras antes e após a síntese do β -TCP. Na Figura 4.4, representativa dos pós não calcinados, observam-se apenas grandes aglomerados.

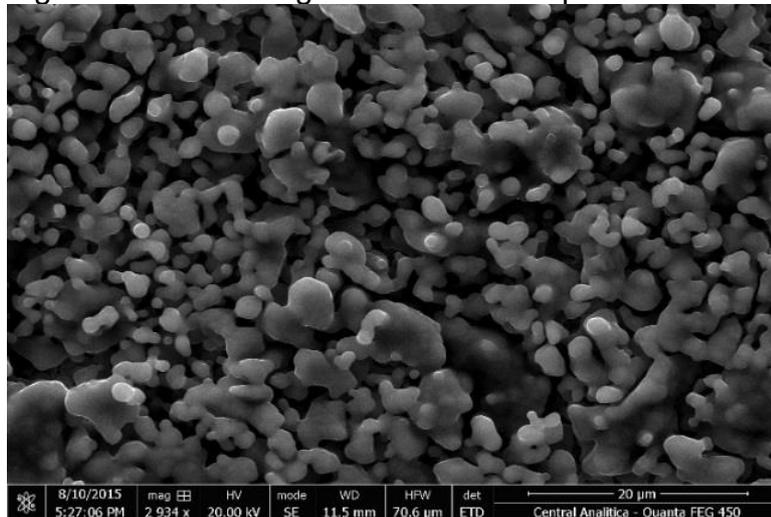
Figura 4.4 – Morfologia da amostra antes da calcinação.



Fonte: Central Analítica, 2015.

Ao se comparar a Figura 4.4 com a Figura 4.5, abaixo, evidencia-se uma mudança radical de morfologia, após o tratamento térmico, com a formação de partículas globulares ou esféricas. Apesar de não ocorrer sinterização, é possível notar a formação de pescoços entre as partículas.

Figura 4.5 – Morfologia da amostra de β -TCP.

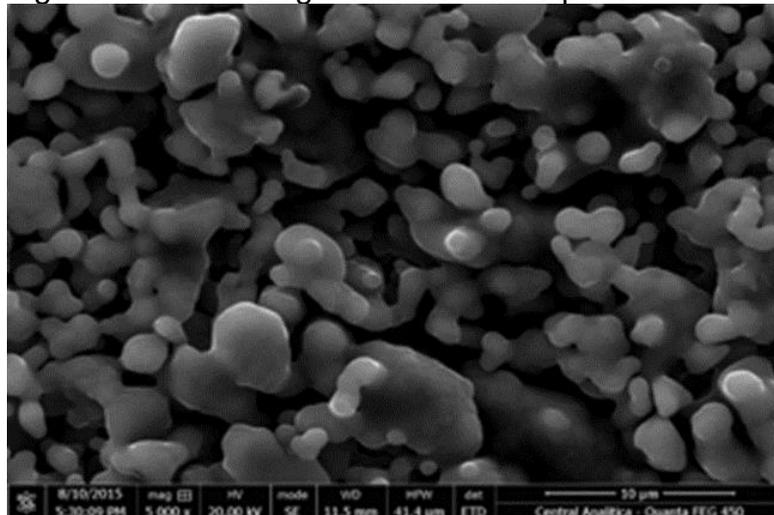


Fonte: Central Analítica, 2015.

Constatou-se que a calcinação, realizada a 1000 °C, promoveu o crescimento das partículas levando a uma densificação aparente do material. Através de medições realizadas a partir do programa ImageJ, obteve-se diâmetro médio de 3,52 µm.

Neste ponto, é interessante destacar a diferença entre os métodos adotados para determinação do tamanho de partículas. A análise de BET é feita para amostras pulverizadas, enquanto MEV faz uso de peças moldadas. Por isso, as amostras calcinadas, caracterizadas na forma de pós (BET) e na forma de corpos de prova prensados (MEV), forneceram resultados distintos para tamanho das partículas. Nas amostras avaliadas por MEV, embora não tenha ocorrido a sinterização propriamente dita, observaram-se fenômenos associados à mesma, como a formação de pescoços, o crescimento de grão e a densificação, razões pelas quais, ao se analisar as micrografias, encontraram-se apenas estruturas micrométricas, diferente das nanopartículas identificadas no BET. Esse caráter micrométrico das partículas também é percebido visualmente, principalmente, quando se considera o maior aumento (Figura 4.6). Vale ainda salientar que, devido à sua área superficial elevada, amostras de apatitas constituídas de pós nanométricos densificam mais facilmente, mesmo quando aquecidas a baixas temperaturas.

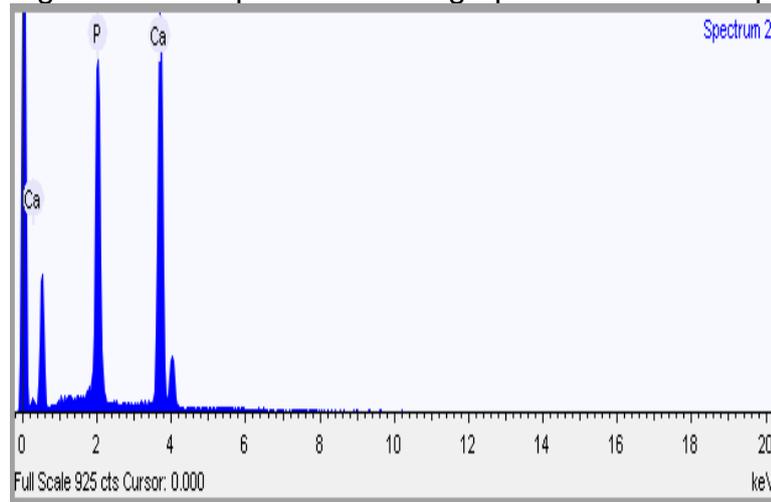
Figura 4.6 – Morfologia da amostra de β -TCP.



Fonte: Central Analítica, 2015.

A composição elementar das amostras calcinadas de β -TCP foi determinada por meio de EDS (Figura 4.7), confirmando, mais uma vez, a presença dos elementos característicos das apatitas

Figura 4.7 – Mapeamento dos grupos funcionais do β -TCP.



Fonte: Central Analítica, 2015.

A Tabela 4.1 mostra a análise quantitativa feita por MEV/EDS para confirmar a razão molar entre Ca/P e os elementos presentes.

Tabela 4.1 – Análise quantitativa para razão molar de Ca/P do β – TCP

ELEMENTO	PESO (%)	ATÔMICO (%)
Fósforo	19,776	15,256
Cálcio	39,084	23,301
Oxigênio	41,139	61,442

Fonte: Central Analítica, adaptada, 2015.

A razão molar de Ca/P, calculada através do percentual atômico (Tabela 1), foi de 1,52. Segundo a literatura, o β -TCP apresenta razão molar de 1,50 (LIU, 2017; RENAUDIN *et al.*, 2017; HASSAN *et al.*, 2016; BUTLER e GROSS, 2017; TORRESA *et al.*, 2016) o que corrobora a formação da amostra desejada.

4.1.5 Citotoxicidade *in vitro*

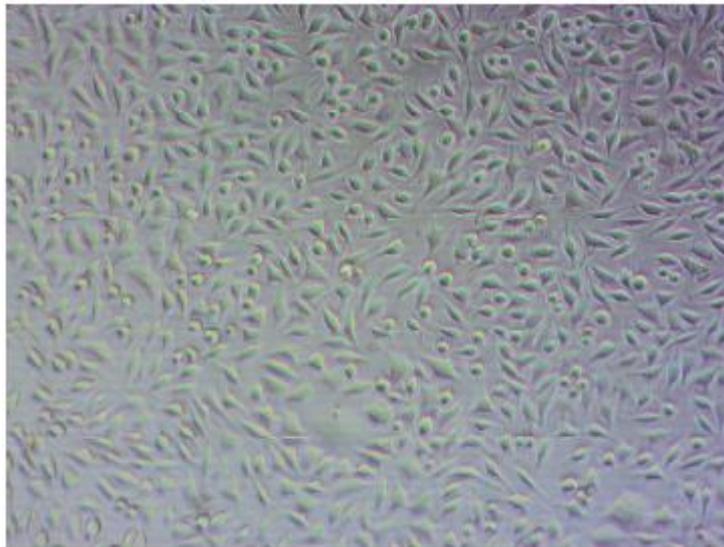
Para avaliar o potencial citotóxico da amostra, foi realizada uma análise qualitativa e quantitativa de acordo com a norma ISO 10993-5. A avaliação foi realizada tanto para amostra de beta fosfato tricálcico como para a amostra de referência Zdec (dietilditiocarbamato de zinco), considerada como o controle positivo para análise. O poço de controle com as células (NCTC Clone L929), em meio de cultura MEM, foi considerado como o controle negativo.

O meio de cultura das células, considerado como o controle negativo e a substância Zdec, controle positivo foram utilizados para verificar a eficácia do ensaio de

citotoxicidade. A amostra escolhida para ser o controle negativo, deve ser um material que não cause prejuízo às células e deve ser atóxico, enquanto que o controle positivo deve ser um material que cause nocividade celular, ou seja, deve ser tóxico (DAGUANO, 2007).

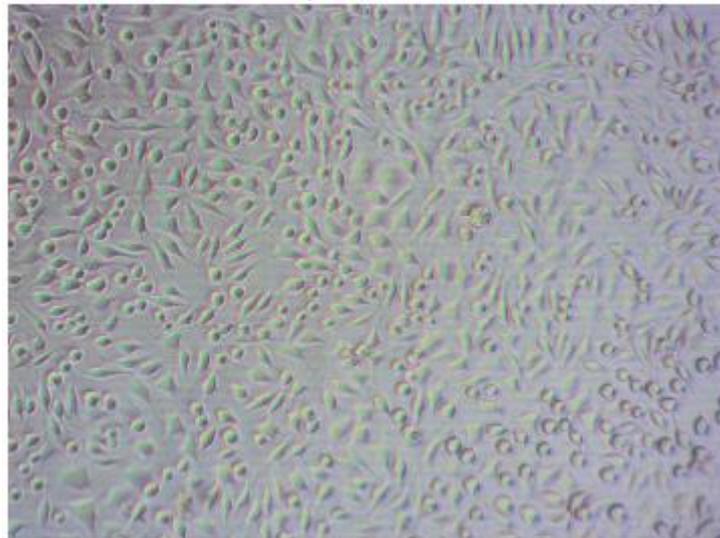
Na análise qualitativa a amostra de fosfato não apresentou alterações celulares morfológicas, como também não inibiu o crescimento celular, conforme as Figuras 4.8 e 4.9.

Figura 4.8 – Representativa do poço de controle com as células (NCTC Clone L929), em meio de cultura MEM. Aumento de 10x.



Fonte: Biotechcell, 2016.

Figura 4.9 – Representativa do poço de células (NCTC clone L929) incubadas com a substância de β -TCP. Aumento de 10x.



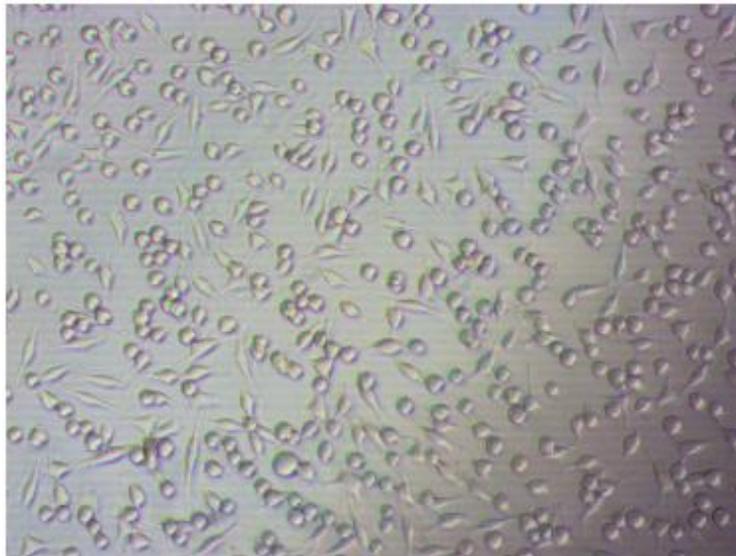
Fonte: Biotechcell, 2016.

De acordo com os resultados as amostras não apresentaram nenhuma reatividade, sem redução do crescimento celular, sendo classificada como GRAU 0 (ISO10993-5, 2009). O resultado foi considerado promissor, pois a amostra apresentou comportamento semelhante ao poço de controle (Figura 4.8) em todas as concentrações testadas.

Alguns pesquisadores relatam a citotoxicidade como ensaio de biocompatibilidade. De acordo com Zou e seus colaboradores (2005), o β -TCP sintetizado por precipitação em solução aquosa e calcinado a 900 °C, durante 3 horas, apresentou resultados satisfatórios de biocompatibilidade. Geng (2009), utilizando uma linhagem celular semelhantes a osteoblastos (MG63), mostrou que o magnésio revestido com β -TCP não é tóxico, portanto biocompatível para reparação óssea.

Para a amostra de referência Zdec a análise qualitativa apresentou completa destruição da camada de células, inibindo o crescimento celular, conforme a comparação entre as Figuras 4.10 e 4.11. Assim, a amostra foi classificada como grau 4, ou seja, possui reatividade severa.

Figura 4.10 – Representativa do poço de controle com as células (NCTC Clone L929), em meio de cultura MEM.



Fonte: Biotechcell, 2016.

Figura 4.11 – Representativa do poço de células (NCTC clone L929), incubadas com a substância de referência Zdec.



Fonte: Biotechcell, 2016.

A eficácia da análise também pode ser verificada visualmente pela aparência das imagens nos poços das placas usadas, contendo células tratadas com diferentes diluições do extrato de cada amostra. Portanto, onde ocorreu maior morte celular (controle positivo em concentração de extrato 100%) a imagem não permitiu a visualização das células, indicando a não precipitação do MTT (Figura 4.11). Por outro lado, para os micropoços nos quais as células permaneceram vivas, o meio apresentou um aspecto rugoso, indicando que não houve reatividade na presença do fosfato tricálcico (Figura 4.9).

Desta forma, é possível afirmar que o fosfato de cálcio utilizado no ensaio *in vitro* de citotoxicidade, demonstrou biocompatibilidade, não apresentando efeito tóxico. Logo é adequado para aplicações biomédicas (ROGERO *et al.*, 2003).

Na análise quantitativa do fosfato de cálcio a viabilidade apresentou valor de 100%, enquanto que a amostra de referência, Zdec, ficou com 0,012%, calculados utilizando a equação 4.1, da norma ISO 10993-5.

$$\text{Viab. \%} = \frac{100 \times \text{OD}_{570e}}{\text{OD}_{570b}} \quad (4.1)$$

Onde:

Viab. %: viabilidade em porcentagem

OD_{570e}: valor médio de densidade óptica na amostra 100% do extrato.

OD_{570b}: valor médio de densidade óptica medida no poço de controle com as células NCTC Clone L929.

Portanto, nas condições laboratoriais testadas, a amostra de beta fosfato tricálcico, por apresentar valor de viabilidade celular maior que 90% não é tóxica. Enquanto a Zdec, mostrou viabilidade menor do que 50%, caracterizando o material como tóxico (ISO10993-5, 2009).

Tal qual esta pesquisa, vários autores mencionam a biocompatibilidade das biocerâmicas de fosfato de cálcio. De acordo com ZOU e colaboradores (2005), o β -TCP sintetizado por precipitação em solução aquosa e calcinado a 900°C, durante 3 horas, apresentou resultados satisfatórios de biocompatibilidade. GENG e outros pesquisadores (2009), utilizando uma linhagem celular semelhante a osteoblastos (MG63), mostrou que o magnésio revestido com β -TCP é não tóxico e biocompatível. ALCAIDE e coautores (2009), ao analisarem uma mistura de hidroxiapatita (27%) e β -TCP/agarose (73%), utilizando uma linhagem celular de fibroblastos e osteoblastos, constataram que o biomaterial é biocompatível para utilização em processos de reparação óssea. CHEN e outros autores (2015) verificaram a citotoxicidade em três fases de fosfato de cálcio: β -TCP puro, bifásico (hidroxiapatita/ β -TCP) e hidroxiapatita pura. Como não ocorreram alterações significativas dos tratamentos em relação ao controle, no teste MTT, a não toxicidade das amostras foi novamente comprovada.

4.2 Caracterização do biocimento

4.2.1 Resistência à compressão diametral e análise estatística

Para melhorar a resistência inicial de biocimentos de fosfatos de cálcio, bem como hidratação e tempo de pega, podem ser adicionadas pequenas concentrações de uma segunda fase na matriz de fosfato de cálcio durante o processo de elaboração do biocimento. Uma vez adicionada a segunda fase, os materiais devem ser adequadamente testados a fim de se verificar se houve realmente incremento de resistência. Para materiais frágeis, como os cerâmicos, não convém, o emprego de ensaios de tração para determinação de sua resistência mecânica. O mais adequado é o ensaio de compressão diametral, tendo em vista que, devido ao fenômeno de propagação das trincas, as cerâmicas resistem melhor a forças de compressão do que a forças de tração. Um mesmo material cerâmico pode resistir sem fraturar por muitos anos, mesmo havendo rachaduras em sua estrutura.

Convém ainda observar que a propagação das trincas se comporta de maneira diferente em compressão e em tração. Enquanto na tração, a preocupação é

com a maior e mais favorável trinca e sua rápida propagação, na compressão, a preocupação é com o tamanho da falha média, uma vez que as trincas tendem a se propagar de forma mais estável ao longo do eixo de ação da carga (BOHNER, 2007; BARRALET *et al.*, 2000).

A Tabela 4.2 apresenta os dados referentes às resistências no teste de compressão diametral (MPa) para os biocimentos com adição de 3%, 5%, 10%, 20% e 30% em peso de hidrogeno fosfato de cálcio (monetita).

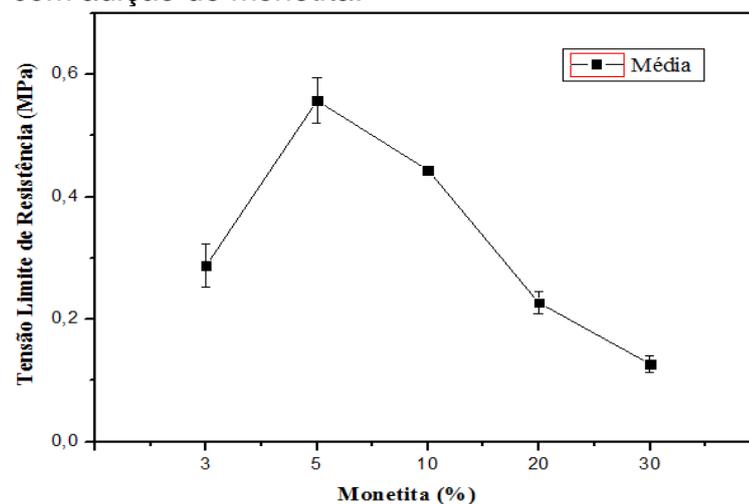
Tabela 4.2 – Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral dos biocimentos com adição de monetita.

Adição de monetita (%)	Resistência (MPa)	Desvio Padrão
3	0,29	0,06
5	0,56	0,06
10	0,44	0,01
20	0,23	0,03
30	0,13	0,02

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 4.12, os dados da Tabela 4.2 foram inter-relacionados graficamente. Pode-se observar que o aumento no teor do aditivo gera aumento da resistência, até que seja atingido um limite (cerca de 5%), a partir do qual começa a decair.

Figura 4.12 – Ensaio de resistência à compressão diametral dos biocimentos com adição de monetita.



Fonte: Elaborada pela autora.

A diminuição da resistência à compressão com adição de 10% de monetita, por sua vez, pode ser explicada pelo aumento de porosidade associado à maior

quantidade de líquido utilizada na preparação. Tal resultado é confirmado pelo modelo matemático proposto por Knudsen (YOSHIMURA *et al.*, 2005), no qual a resistência mecânica dos materiais cerâmicos diminui exponencialmente de acordo com a elevação do nível de porosidade.

A ANOVA utilizada para avaliar a significância do efeito das variáveis da porosidade está descrita na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Análise de variância da resistência à compressão dos biocimentos com adições de monetita.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Soma de Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)	Razão entre QM (F)	p -valor
Varição entre tratamentos	4	0,35431	0,08858	47,79317	1,74555E-6
Varição dentro de cada tratamento (erro)	10	0,01853	0,00185		
Varição total	14	0,37284			

Fonte: Elaborada pela autora.

Na estatística clássica, o nível descritivo ou probabilidade de significância (p -valor) corresponde ao menor nível de significância com que se rejeita a hipótese nula. Em termos gerais, um p -valor pequeno significa que a probabilidade de se obter um valor da estatística de teste como o observado é muito improvável, levando assim à rejeição da hipótese nula.

Ao se realizar a ANOVA, foi observado que a adição do hidrogeno fosfato de cálcio influencia de maneira significativa a resistência à compressão dos biocimentos para um nível de confiança de 95%. Neste caso, como o p -valor foi 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 monetita. Com base nesse resultado, foi preciso utilizar o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. Embora a ANOVA evidencie que a distribuição de pelo menos um dos grupos se difere das demais, ela não indica entre quais grupos a diferença é significativa. Nesse sentido, Tukey-Kramer permite explorar mais os dados avaliados ao comparar todos os possíveis pares de médias entre si e indicar onde há realmente diferenças significativas.

A Tabela 4.4 apresenta os níveis de diferenças estatisticamente significativas entre as resistências à compressão com as adições do hidrogeno fosfato de cálcio.

Tabela 4.4 – Teste de Tukey-Kramer correspondente à resistência à compressão dos biocimentos com adições de monetita.

Comparação Níveis	Diferença Absoluta	Erro-Padrão da Diferença	Significância
5 – 3	0,27000	0,23136	1
10 – 3	0,15667	0,23136	1
10 – 5	-0,11333	0,23136	0
20 – 3	-0,06000	0,23136	0
20 – 5	-0,33000	0,23136	1
20 – 10	-0,21167	0,23136	1
30 – 3	-0,16000	0,23136	1
30 – 5	-0,43000	0,23136	1
30 – 10	-0,31667	0,23136	1
30 – 20	-0,10000	0,23136	0

Significância igual a 1 indica que a diferença de média é significativa no nível 0,05.

Significância igual a 0 indica que a diferença de média não é significativa no nível 0,05

De acordo com o nível de significância igual a zero, os biocimentos com 5% – 10%, 3% – 20% e 20% – 30% de aditivo, produzem aproximadamente a mesma resistência à compressão diametral, enquanto, todos os outros níveis de concentração testados produzem resistências significativas diferentes.

A partir deste ponto, todas as caracterizações e testes que se seguiram, foram realizados com o biocimento adicionado de 5% de monetita.

4.2.2 Difração de Raios X (DRX)

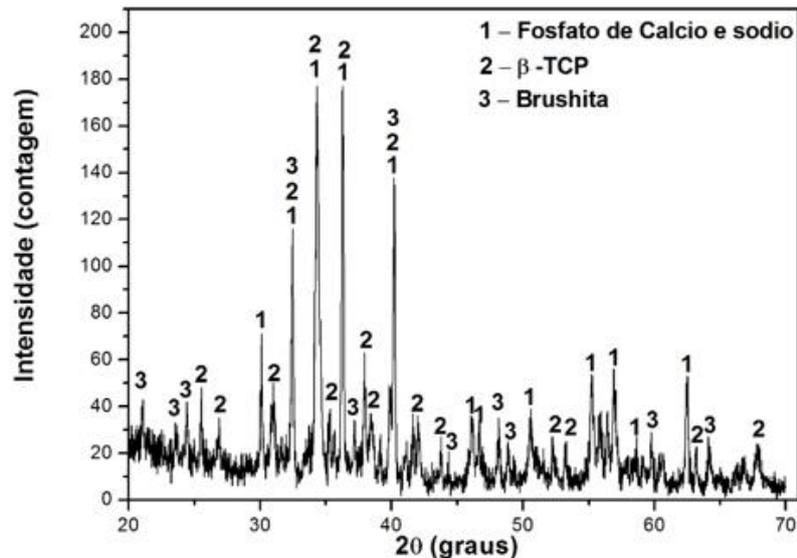
A Figura 4.13 apresenta o padrão de difração do biocimento. A análise DRX revelou a presença das fases β -fosfato tricálcico, fosfato de cálcio di-hidratado (brushita) e fosfato de cálcio e sódio de acordo com as fichas (JCPDS) 70-2065, 01-0395 e 45-0339, respectivamente.

A identificação da fase β -TCP como uma das fases predominantes no biocimento confirma a síntese do fosfato tricálcico por reação em estado sólido.

A brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e o fosfato de cálcio e sódio [$\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$] são produtos da reação entre fosfato tricálcico, hidrogeno fosfato de cálcio e a solução de

fosfato de sódio. Quando íons de metais alcalinos (Na, K) são combinados a fosfato tricálcico formam-se cerâmicas de substituição óssea facilmente reabsorvíveis contendo $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ e $\text{Ca}_{10}\text{K}(\text{PO}_4)_7$, respectivamente, cujas estruturas são muito próximas a da β -TCP.

Figura 4.13 – Difração de raios X do biocimento



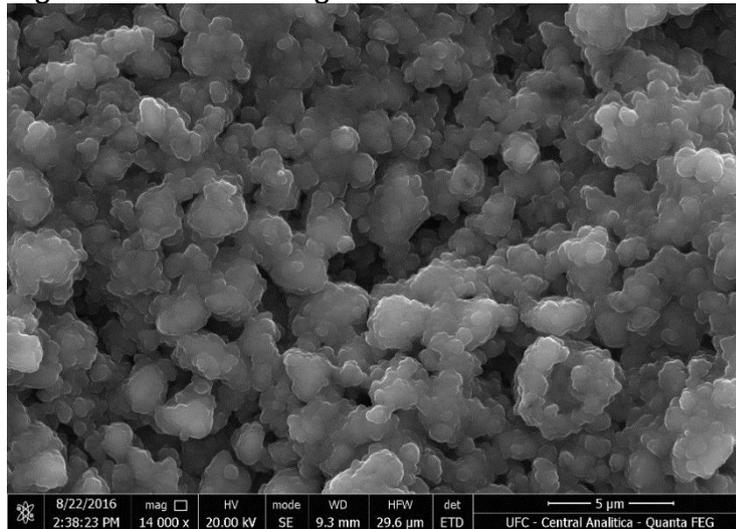
Fonte: Elaborada pela autora

Os resultados obtidos nesta pesquisa são semelhantes aos encontrados por outros autores, que utilizaram métodos de síntese de biocimento equivalentes (CAMARGO, 2007; GINEBRA *et al.*, 2004; GBURECK *et al.*, 2007; MIYAMOTO *et al.*, 1995).

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A micrografia obtida do biocimento permite observar uma microestrutura microporosa e aglomerados constituídos por finos fragmentos de cristais de fosfatos de cálcio (Figura 4.14) fato que condiz com a literatura. Fosfatos de cálcio obtidos pelo método via estado sólido, de maneira geral, são formados por finas partículas nanométricas aglomeradas. Estas, quando submetidas a tratamentos térmicos, formam biocimentos com morfologias diferenciadas em função da composição Ca/P molar (BARRALET *et al.*, 2002; SARGIN *et al.*, 1997; CARDOSO *et al.*, 2012).

Figura 4.14 – Morfologia da amostra do Biocimento



Fonte: Central Analítica, 2016.

Vale salientar que o emprego da solução de fosfato de sódio, na etapa de preparação do biocimento, favorece a precipitação de fosfato de cálcio di-hidratado em composições de cimento à base de β -fosfato tricálcico, como também aumenta a resistência mecânica das composições (CAMARGO *et al.*, 2007; ISHIKAWA, 2008). É possível, inclusive, que a formação do fosfato de cálcio di-hidratado na amostra colabore para a redução do tamanho das partículas.

4.2.4 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

De acordo com Dorozhkin (2008), um cimento ósseo deve cumprir alguns requisitos do ponto de vista clínico, tais como: resistência mecânica apropriada durante o período requerido, fácil manipulação, ausência de toxicidade, perfeita adesão ao tecido ósseo, ausência de características alergênicas e cancerígenas e pH neutro (6,5-8,5), durante e depois da cicatrização, para evitar efeitos citotóxicos. Dos requisitos mencionados, Dorozhkin (2009) afirma que o pH é o principal fator controlador das concentrações de Ca e P na solução de cimento, afetando as taxas da reação de pega.

Para se compreender bem a relação existente entre pH e tempo de pega, é preciso ter em mente que a reação de pega dos biocimentos de fosfato de cálcio depende dos componentes do cimento em pó. Quando os constituintes do biocimento (sais de fosfato de cálcio) são misturados com o líquido para a reação, ocorre sua solubilização até que a composição do líquido encontre um ponto invariante, para o caso de vários componentes, ou um ponto de saturação da solução, quando há um único sal. Esse ponto determinará o tipo de precipitado. Valores de pH situados dentro do intervalo de

6,5 a 8,5 (como no presente estudo em que o biocimento apresentou potencial hidrogeniônico de $8,52 \pm 0,21$) tendem a precipitar formas de hidroxiapatitas deficientes em cálcio [$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$], mas dependendo do processo e das condições reacionais, tipos diferentes de sais de fosfato podem ser obtidos concomitantemente.

Vale ainda salientar que os principais parâmetros que afetam a variação de pH durante a pega compreendem: a composição química, a proporção dos reagentes na mistura, o tamanho relativo de partículas dos componentes principais do cimento, o uso de aceleradores ou retardadores na fase líquida e sua concentração relativa, a razão líquido/pó e a temperatura.

4.2.5 Porosidade aparente

Em biocimentos, há de se considerar a existência de dois tipos de porosidade: a fechada e a aparente ou aberta, assim chamada por se relacionar aos poros intercomunicáveis que têm acesso à superfície. Poros fechados normalmente não podem ser detectados e, por isso, a porosidade é geralmente caracterizada com base na porosidade aberta. Em poucas palavras, 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). Ela não só é mais fácil de ser medida experimentalmente, se comparada com a fechada, como também, em muitos casos, é de relevância para a osseointegração de materiais biocompatíveis, pois afeta diretamente sua osteocondutividade. Além disso, os poros servem como suportes para o crescimento de tecidos e cultura de células (RÖDEL *et al.*, 2008).

Existem, entretanto, diretrizes gerais sobre o nível de porosidade total para osteointegração (< 50%) e o tamanho mínimo para interconexão (HING, 2005). Via de regra, o valor ideal para porosidade depende da aplicação clínica pretendida. Não se pode esquecer também que porosidade elevada pode comprometer a resistência mecânica dos materiais cerâmicos, conforme comprovado anteriormente. Assim, é necessário equilíbrio entre essas duas propriedades.

Neste trabalho, a porosidade aparente calculada foi de 35,2% com desvio padrão de 0,1. Coelho *et al.* (2012), trabalhando com diferentes formulações de cimentos de fosfato de cálcio e alginato de sódio, encontraram valor de porosidade média de 33,32%.

4.2.6 Tempo de pega

O tempo de pega está relacionado ao tempo de trabalho, isto é, ao tempo disponível para se preparar e fazer a aplicação definitiva do biocimento *in situ* (BOHNER, 2007). De acordo com Driessens *et al.* (1997), um biocimento de fosfato de cálcio deve ter um tempo de pega que não seja excessivamente longo a fim de permitir a manipulação apropriada. O tempo de preparo da pasta deve ser próximo ao tempo de pega inicial, em média, de até 5 minutos.

A Tabela 4.5 apresenta os tempos de pega inicial e final, juntamente com a média aritmética e o desvio padrão do biocimento.

Tabela 4.5 – Tempo inicial e final de pega do biocimento.

Tempo de pega inicial (t_i)	Média t_i (minutos)	Desvio Padrão t_i (minutos)	Média t_f (minutos)	Desvio Padrão t_f (minutos)
Tempo de pega final (t_f)				
Biocimento	3,27	0,26	20,90	1,95

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a literatura, deseja-se um tempo de pega o menor possível para impedir que o cimento migre para locais indesejados, fora do local injetado. Porém, esse tempo não pode ser tão curto que impeça ou dificulte qualquer um dos processos de mistura, homogeneização ou injeção (DRIESSENS *et al.*, 2000; KHAIROUN *et al.*, 1997; DRIESSENS *et al.*, 1993). Khairon *et al.* (1997) afirmam que para aplicações dentárias, t_i deve ser próximo a 3 min enquanto que para aplicações ortopédicas o valor pode se aproximar de 8 min.

4.3 Estudo da liberação controlada do biocimento com o fármaco

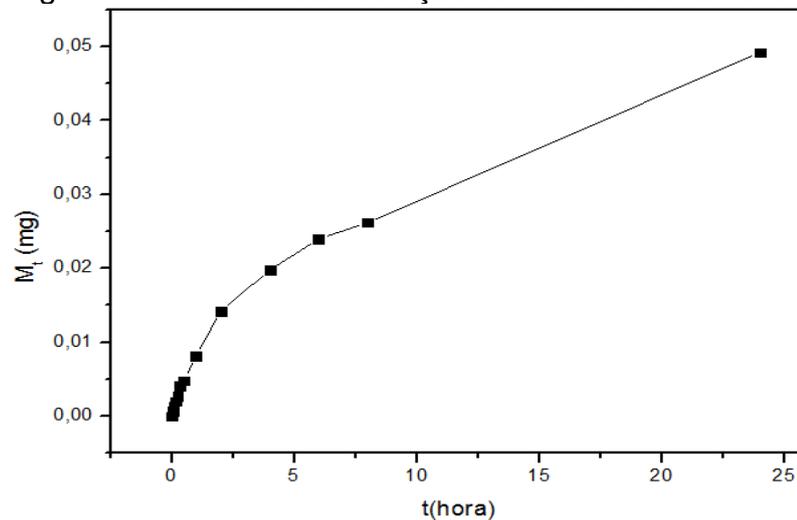
A Indometacina foi o fármaco escolhido nesta pesquisa em virtude da sua ação anti-inflamatória utilizada no tratamento de uma série de condições como artrite reumatoide artrite reumatoide juvenil moderada a severa, osteoartrite, artropatia do quadril, espondilite anquilosante, artrite gotosa aguda, distúrbios musculoesqueléticos agudos, como bursite, tendinite, sinovite, tenossinovite, capsulite do ombro, entorses e distensões, lombalgia e edema após procedimentos cirúrgicos ortopédicos (ROBERTS e MARROW, 2001). Seu emprego na forma oral pode causar efeitos colaterais tais como dor de cabeça, vertigem, tontura, fadiga, depressão, atordoamento, náusea, dor

abdominal, diarreia, entre outros. Assim, é de grande importância, nesses tratamentos, maximizar o acesso do fármaco a sítios ósseos específicos e controlar a liberação da substância, mantendo-se a dosagem indicada por todo o período do tratamento, sem provocar o aparecimento de efeitos colaterais nem a perda da eficiência.

Com o objetivo de verificar a conexão entre a incorporação do fármaco e as propriedades químicas e mecânicas do biocimento, foi realizado um estudo da liberação controlada da indometacina incorporada no biomaterial.

O perfil de liberação do fármaco a partir do biocimento foi estudado em função do tempo, como apresentado na Figura 4.15. Os resultados indicam que em 24 horas de experimento, 1,65% do fármaco foram liberados.

Figura 4.15 – Perfil de liberação da Indometacina no biocimento

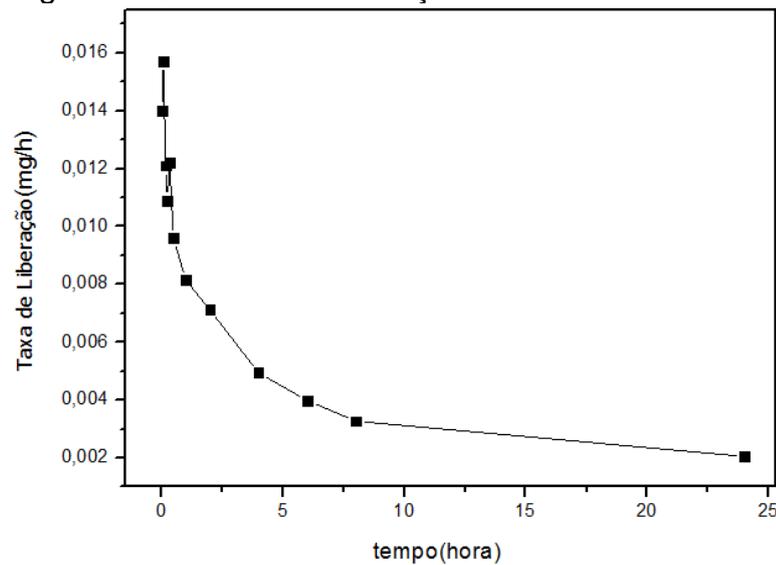


Fonte: Elaborada pela autora.

Essa liberação inicial é atribuída à dissolução imediata da quantidade de fármaco localizada na superfície da amostra. O decréscimo no perfil de liberação provavelmente ocorre em função da porosidade existente no corpo de prova. Este fato sugere a existência de alguma interação de natureza desconhecida entre o hidrogeno fosfato de cálcio, utilizado como aditivo, e o fármaco.

A Figura 4.16 apresenta a taxa de liberação de indometacina do biocimento com 0,3% de anti-inflamatório. A amostra apresenta taxa de liberação decrescente em função do tempo, como observado no perfil da Figura 4.15, visto que a quantidade de fármaco liberada vai diminuindo ao longo do tempo.

Figura 4.16 – Taxa de liberação da Indometacina no biocimento.



Fonte: Elaborada pela autora.

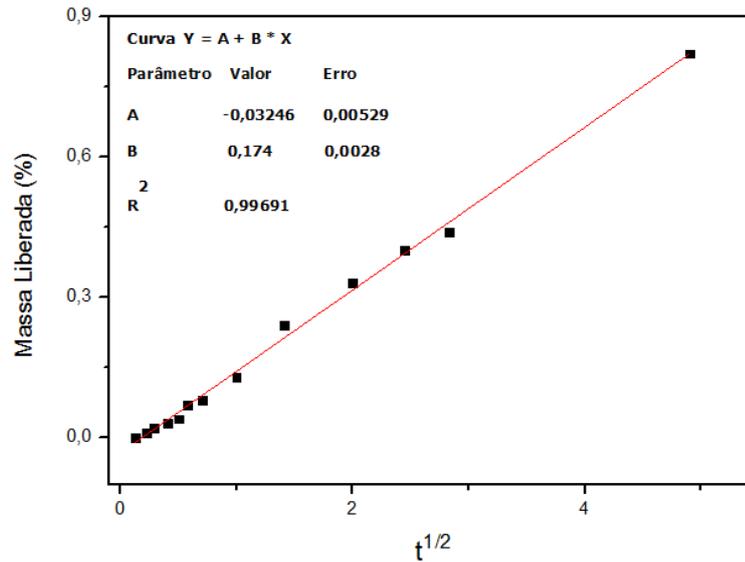
Pesquisadores realizaram o estudo de liberação de indometacina em biocimentos de fosfato de cálcio e obtiveram resultados semelhantes (OTSUKA *et al.*, 1994; OTSUKA *et al.*, 1997; OTSUKA *et al.*, 1998).

Para investigar mais precisamente o efeito da estrutura devido à formulação, os resultados foram analisados de acordo com o modelo de Higuchi (Figura 4.17). Em seguida, foi determinado o valor do coeficiente de liberação (n), utilizando a equação de Korsmeyer-Peppas (COSTA e LOBO, 2001).

Higuchi descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. Desse modo, um gráfico da quantidade liberada do fármaco versus a raiz quadrada do tempo será linear se as condições previamente estabelecidas forem cumpridas. Esta relação tem sido muito utilizada para descrever a liberação de fármacos por vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada (DESAI *et al.*, 1966a; DESAI *et al.*, 1966 b; SCHWARTZ, SIMONELLI, HIGUCHI, 1968a; SCHWARTZ, SIMONELLI, HIGUCHI, 1968b; AULTON, 2005).

A Figura 4.17 mostra a cinética de liberação de indometacina no biocimento. Aplicando os modelos de equações cinéticas, o mecanismo de liberação de fármacos seguiu o modelo de Higuchi, uma vez que se observou alta linearidade, com coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,98.

Figura 4.17 – Modelo de Higuchi para as 24 horas de liberação de indometacina.



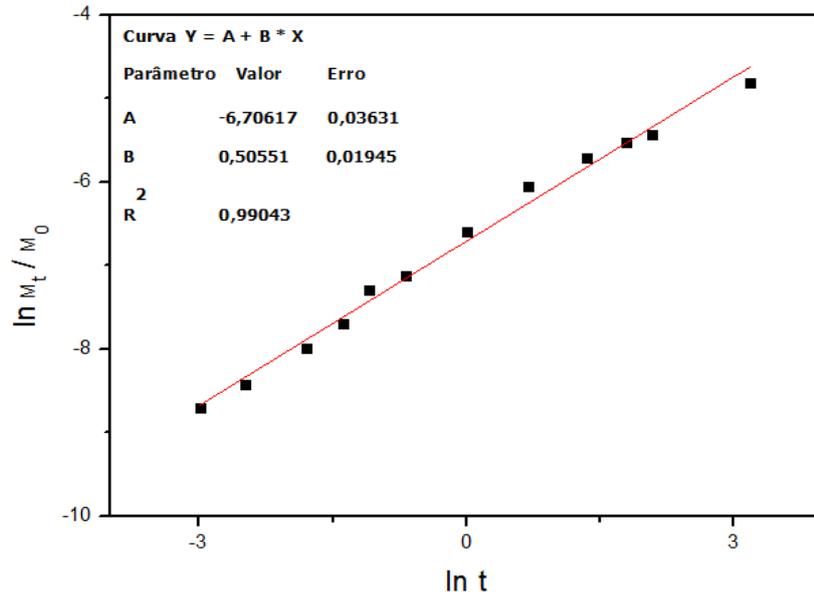
Fonte: Elaborada pela autora.

Embora um pequeno desvio da linearidade tenha sido observado, a análise mostra uma boa correlação entre os dados, indicando que a liberação do anti-inflamatório 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).

O modelo desenvolvido por Korsmeyer e Peppas (KORSMEYER, PEPPAS, 1981; KORSMEYER *ET AL.*, 1983) leva em consideração as características estruturais e geométricas da forma de liberação controlada e adota um expoente de liberação para a liberação do fármaco (n). Peppas *et al.*, (1986) usou o valor de n de modo a caracterizar os diferentes mecanismos de liberação, tendo chegado a valores de $n = 0,5$ para a difusão (modelo de Fick) e valores de n mais elevados entre 0,5 e 1,0 num sistema plano, para a transferência de massa segundo um modelo não-Fickiano.

De acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas, uma reta foi obtida pelo gráfico de liberação de indometacina (FIGURA 4.18).

Figura 4.18 – Modelo de Korsmeyer - Peppas para as 24 horas de liberação de indometacina.



Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da regressão linear mostrou um valor de expoente de liberação (n) igual a 0,5 indicando que a liberação do fármaco segue a lei por difusão de Fick (AULTON, 2005).

4.4 Caracterização e análise estatística do biocimento com e sem o fármaco

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 mecânicas dos biocimentos antes e após a adição do fármaco.

4.4.1 Tempo de pega

De acordo com a literatura, a adição de medicamento altera as propriedades físico-químicas dos cimentos (HESARAKI *et al.*, 2009; RATIER *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2001). Por esta razão, os tempos de pega inicial e final foram avaliados em dois momentos: antes e após a adição da indometacina. A Tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos em que se pode observar um aumento no tempo final de pega após incorporação do fármaco.

Tabela 4.6 – Tempo inicial e final de pega do biocimento com e sem adição do fármaco.

Tempo de pega inicial (t_i)	Média t_i (minutos)	Desvio Padrão t_i (minutos)	Média t_f (minutos)	Desvio Padrão t_f (minutos)
Tempo de pega final (t_f)				
Biocimento	3,27	0,26	20,90	1,95
Biocimento com fármaco	3,40	0,28	32,13	1,13

Fonte: Elaborada pela autora.

Usualmente, os tempos de pega são medidos com a utilização do aparelho de Vicat e define-se o início de pega como o intervalo de tempo transcorrido desde a adição de água ao cimento até o momento em que a agulha de Vicat correspondente penetra na pasta até uma distância de (4 ± 1) mm da placa base. Há também um ensaio alternativo utilizando a agulha de Gilmore que, em geral, resulta em um maior valor para o início de pega. Alguns pesquisadores, utilizando o método de *Gilmore* para a determinação do tempo inicial de pega, estabeleceram o limite mínimo de 5 minutos para o início do processo. Contudo, levando em conta que, neste trabalho, o método utilizado foi o de *Vicat* adaptado, não se podem descartar os resultados obtidos para as formulações com tempo inicial de pega inferior a 5 minutos (DEL REAL *et al.*, 2002; LEWIS, 2005; KHAIROUN *et al.*, 1997, CAMILLERI, 2014; ALANEZI *et al.*, 2011).

Os resultados de análise de variância utilizados para avaliar a significância do efeito das variáveis do tempo inicial e final de pega dos biocimentos antes e após a adição do fármaco estão descritos nas Tabelas 4.7 e 4.8.

Tabela 4.7 – Análise de variância do tempo inicial de pega do biocimento com e sem adição do fármaco.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Soma de Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)	Razão entre QM (F)	p-valor
Varição entre tratamentos	1	0,02535	0,02535	0,33421	0,59418
Varição dentro de cada tratamento (erro)	4	0,3034	0,07585		
Varição total	5	0,32875			

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4.8 – Análise de variância do tempo final de pega do biocimento com e sem adição do fármaco.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Soma de Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)	Razão entre QM (F)	p -valor
Varição entre tratamentos	1	189,05707	189,05707	73,97081	0,001
Varição dentro de cada tratamento (erro)	4	10,22333	2,55583		
Varição total	5	1,992804			

Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 4.7 apresenta o p -valor igual a 0,59418 para os tempos iniciais de pega, logo não se rejeita a hipótese nula de igualdade de médias para nível de significância $\alpha = 0,05$. Assim, esse resultado permite concluir que para o nível de significância especificado, as médias aritméticas dos tempos de pega inicial dos biocimentos antes e após a incorporação do fármaco são todas iguais. Com base nestes resultados, não foi preciso utilizar o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

Já para tempo final de pega, o p -valor foi de 0,001 (Tabela 4.8). Assim, rejeita-se a hipótese nula de igualdade de médias, ou seja, existe diferença significativa na média aritmética do tempo de pega final entre os biocimentos antes e após adição da indometacina. Desta forma, foi preciso utilizar o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer (Tabela 4.9), para verificar onde existiu a diferença.

Tabela 4.9 – Teste de Tukey-Kramer do tempo final de pega do biocimento com e sem adição do fármaco.

Comparação Níveis	Diferença Absoluta	Erro-Padrão da Diferença	Significância
0 – 1	11,22667	7,24837	1

Significância igual a 1 indica que a diferença de média é significativa no nível 0,05

Significância igual a 0 indica que a diferença de média não é significativa no nível 0,05

De acordo com a Tabela 4.9, a adição de 0,3% de indometacina causou uma diferença estatisticamente significativa na média do tempo de pega final do biocimento. Esse resultado é coerente com a literatura, uma vez que a incorporação de medicamentos em cimentos pode interferir no tempo de pega, devido à interação do

fármaco com a matriz mineral do biomaterial durante o processo de formação do biocimento. Dessa maneira, o conjunto de partículas menores e aglomeradas, sofreria desaglomeração com conseqüente dissolução da indometacina interiorizada nas partículas ou adsorvidas às nanoestruturas, o que poderia causar um atraso no tempo de pega do cimento (GINEBRA *et al.*, 2012; HESARAK, *et al.*, 2009; RATIER *et al.*, 2004; MARIÑO *et al.*, 2007; TAKECHI *et al.*, 2002).

Apesar da diferença de valores constatada, ambos permaneceram dentro da faixa considerada ideal (10 - 40 minutos) para cimentos utilizados na ortopedia (DRIESSENS *et al.*, 1993).

4.4.2 Resistência à compressão diametral

A Tabela 4.10 apresenta os dados referentes às resistências no teste de compressão diametral (MPa) para o biocimento antes e após a adição de 0,3% em peso de indometacina. Os valores medidos estão representados graficamente na Figura 4.19.

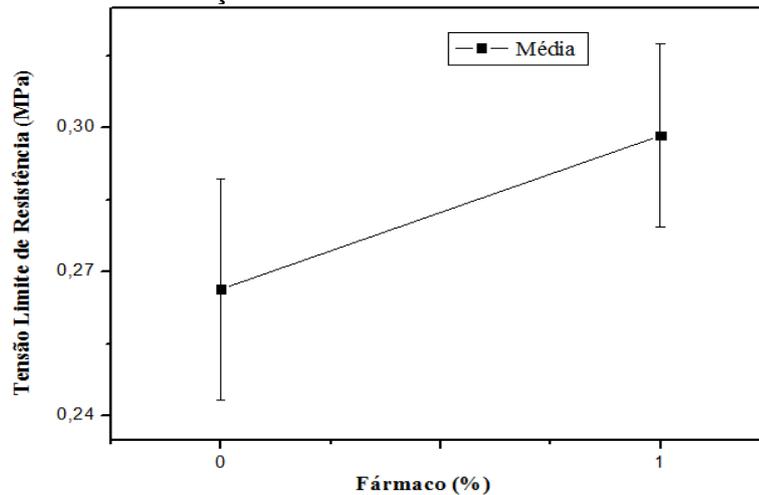
Tabela 4.10 – Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral do biocimento sem e com adição do fármaco.

Adição do fármaco (%)	Resistência (MPa)	Desvio Padrão
0	0,26633	0,03972
0,3	0,29833	0,03302

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.10 e representados graficamente na Figura 4.19, a adição do fármaco não interferiu significativamente na resistência do biocimento incorporado.

Figura 4.19 – Ensaio de resistência à compressão diametral do biocimento sem e com adição do fármaco.



Fonte: Elaborada pela autora.

A ANOVA utilizada para avaliar a significância do efeito das variáveis da resistência à compressão diametral do biocimento antes e após a adição do fármaco está descrita na tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Análise de variância da resistência à compressão diametral do biocimento sem e com adição do fármaco.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Soma de Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)	Razão entre QM (F)	<i>p</i> -valor
Varição entre tratamentos	1	0,00154	0,00154	1,15157	0,34365
Varição dentro de cada tratamento (erro)	4	0,00534	0,00133		
Varição total	5	0,00687			

Fonte: Elaborada pela autora.

Tendo o *p*-valor igual a 0,34365, não se rejeita a hipótese nula de igualdade de médias para nível de significância $\alpha = 0,05$. Este resultado permite concluir que para o nível de significância especificado, as médias aritméticas da resistência a compressão diametral do biocimento antes e após a incorporação do fármaco são iguais, não sendo preciso utilizar o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. Portanto, a incorporação de 0,3% de indometacina no biocimento não interferiu na resistência mecânica do material.

5 CONCLUSÕES

As caracterizações de difração de raios X, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de raios X por dispersão de energia comprovaram que a síntese adotada, via reação em estado sólido, levou à formação de um material homogêneo, tendo como fase cristalina o β -fosfato tricálcico.

Através do BET, o material sintetizado foi caracterizado como nanométrico. Após calcinação a 1000 °C das peças conformadas, as micrografias mostraram que a amostra cerâmica assumiu um caráter mais micrométrico, em função dos fenômenos físicos usualmente observados em temperaturas elevadas para essa classe de materiais, como crescimento de partículas e densificação.

Os resultados de citotoxicidade *in vitro* indicaram que a exposição das células à amostra de β -TCP, nas concentrações avaliadas, não apresentaram alterações celulares morfológicas, como também não inibiram o crescimento celular.

As caracterizações realizadas demonstraram que a reação em fase sólida de hidróxido de cálcio e hidrogeno fosfato de cálcio permite a obtenção de β -TCP monofásico, desde que seja empregada a combinação adequada dos parâmetros de síntese. Portanto, o material obtido não apresenta toxicidade, é biocompatível e se mostra um forte candidato para aplicações biomédicas.

Os resultados da compressão diametral com adições de fosfato de cálcio no biocimento, mostraram que até 5% de adição do aditivo em peso, a resistência aumenta. Já a diminuição da resistência a partir da adição de 10% pode ser explicada devido ao aumento de porosidade, associada à maior quantidade de líquido utilizada na preparação.

A incorporação de 0,3% de indometacina no biocimento não interferiu na resistência mecânica do material.

O biocimento sintetizado é constituído, basicamente, pelas fases fosfato de cálcio e sódio, β -TCP e brushita, conforme pode ser visto no difratograma de raios X. O estudo de caracterização pela técnica de microscopia eletrônica de varredura mostra uma morfologia formada por finos fragmentos de cristais de fosfatos de cálcio aglomerados, apresentando microestrutura microporosa.

O biocimento apresentou potencial hidrogeniônico de $8,52 \pm 0,21$. Isto é importante, pois materiais com pH na faixa de 6,5 a 8,5 são considerados adequados para aplicações clínicas.

A porosidade aparente do biocimento em porcentagem apresentou média aritmética de 35,2% com desvio padrão de 0,1. Nos biomateriais, os poros servem como suportes para o crescimento de tecidos e cultura de células.

Os tempos de pega encontrados para o biocimento estão de acordo com a média da literatura. Para o biocimento incorporado com a indometacina, o tempo de pega final aumentou, o que foi comprovado estatisticamente, mas se manteve no padrão considerado ideal para aplicações biomédicas.

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

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Esta pesquisa consistiu na síntese de β -fosfato de tricálcico via reação estado sólido e obtenção de biocimento como dispositivo para liberação controlada de fármaco. Vários resultados importantes foram obtidos, foi possível estabelecer conexões entre o comportamento na liberação da indometacina e as propriedades estruturais das amostras estudadas. Entretanto, esses resultados ainda são preliminares, devendo ser investigado para consolidar as ideias desenvolvidas. Dessa forma, algumas sugestões seguem para trabalhos futuros.

Fazer um estudo de liberação da indometacina 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 indometacina liberada.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, G. A.; CUADRADO, T. R. **Métodos de caracterización de biomateriales**. In: SASTRE, R.; AZA, S.; ROMÁN, J. S. (Eds). Biomateriales. Faenza: Faenza Editrice Iberica. cap. 9, p. 173-196, 2004.
- ALANEZI, A. Z.; QIANG, Z.; WANG, Y. H.; KAMRAN, E. S.; JIANG, J. Effect of selected accelerants on setting time and biocompatibility of mineral trioxide aggregate (MTA). **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 111, issue 1, January , p. 122-127, 2011.
- ALBUQUERQUE, J. S. V. **Produção de biocimentos de apatitas nanométricas aplicados como sistema de liberação controlada de fármacos**. 2012.199f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- ALBUQUERQUE, J. S. V. **Produção de cerâmicas bioativas porosas de apatitas nanométricas para aplicações biomédicas**. 2010.110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- ALCAIDE, M.; SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; NIETO, A.; VALLET-REGÍ, M.; PORTOLÉS, M. T. L929 Fibroblast and Saos-2 Osteoblast Response to Hydroxyapatite- β TCP/agarose Biomaterial. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 89A, issue 2, p. 539–549, 2009.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR.; L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Editorial Premier. p. 484, 1999.
- AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. **Tokyo: JAAS Press**, 1991.
- ARAÚJO, T. S. **Produção de hidroxapatita pura e dopada para aplicação em biosensores**, Dissertação (Mestrado em Física da Matéria Condensada), Departamento de Física. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2006.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, cap.27, p. 403-443, 2005.
- AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. Laboratório de Química do Estado Sólido, Instituto de Química – UNICAMP, 2002.
- AZEVEDO, A. G. S.; STRECKER, K. Avaliação da influência da razão Ca/P nos valores de cristalinidade e crescimento de cristais durante a sinterização de pós de hidroxiapatita. **Revista eletrônica de materiais e processos (ufcg)**, v. 9, p. 125–129, 2014.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21. São Paulo: VM Cultural, 2011.

BARRALET, J. E.; GROVER, L.; GAUNT, T.; WRIGHT, A. J.; GIBSON, I. R. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. **Biomaterials**, V. 23, p. 3063–3072, 2002.

BARRALET, J. E.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Effect of sintering parameters on the density and microstructure of carbonate hydroxyapatite. **Journal of materials science: materials in medicine**, v. 11, p. 719–724, 2000.

Base de dados – Capes. Disponível em:
<<http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/sites>>. Acesso em: 18 março 2016.

BATISTA, T. S. de A.; SANTOS-FILHO, J. B. **Calcita, hidroxiapatita e β -Fosfato Tricálcio como absorventes de ultravioleta**. Aracaju: Editora IFS, v. 1, 192p, 2016.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BECKER, J. L. **Estatística básica: transformando dados em informação**. Porto Alegre, ed. Bookman, 488p. 2015.

BILLOTTE, W.G. **Ceramic Biomaterials** - Biomedical Engineering Handbook, Second Edition, 2000.

BLEICHER, L.; SASAKI, J. M.; PAIVA SANTOS, C. O. Development of a graphical interface for the Rietveld refinement program DBWS, **Journal Applied Crystallography**, v. 33, 2000.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury, International Journal of the care of the Injured**, v. 31, p. 37-47, 2000.

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, 1997.

BOHNER, M. Reactivity of calcium phosphate cements. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, p. 3980–3986, 2007.

BOVERHOF, D. R.; BRAMANTE, C. M.; BUTALA, J. H.; CLANCY, S. F.; LAFRANCONI, M.; WEST, J.; GORDON, S. C. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, p. 137–150, 2015.

BRAGA, F. J. C. **Materiais aplicados na medicina e odontologia**. Artliber, 496p, 2015.

BROWN, M. E. **Introduction to thermal analysis: techniques and applications**. London: Chapman and Hall, p. 211, 1988.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, p. 309-319, 1938.

BRUNNER, T. J.; GRASS, R. N.; BOHNER, M.; STARK, W. J. Effect of particle size, crystal phase and crystallinity on the reactivity of tricalcium phosphate cements for bone reconstruction. **Journal. Materials. Chemistry.**, v. 38, p. 4072-4078, 2007.

BUI, V. X. **Élaboration de biomatériaux verres-substances actives (zolédronate-chitosane): caractérisations physico-chimiques: expérimentations "in vitro"**. These (Docteur, Ecole doctorale Sciences de la Matière) – Rennes – França - Université de Rennes – UR, 2011.

BUSQUETS, R. Emerging nanotechnologies in food science. **Elsevier Micro & Nano Technologies Series**, p. 1, 2017.

BUTLER, D. H.; GROSS, R. S. Formation of biphasic hydroxylapatite-beta magnesium tricalcium phosphate in heat treated salmonid vertebrae. **Scientific Reports 7**, Article number: 3610, 2017.

CALIMAN, L. B. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida a partir da casca de ovo de avestruz**. 2011. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, Vitória, 2011.

CAMILLERI, J. **Mineral trioxide aggregate in dentistry**. From preparation to application. Springer. 2014.

CAMARGO, N. H. A.; CHELLAT, F.; FERNANDES, J.; FOLGUERAS, M. V.; GEMELLI, E.; YAHIA, L. **Estudo do comportamento de culturas de osteoblastos numa matriz cerâmica de fosfato de cálcio pela técnica de microscopia eletrônica de varredura**. *In*: VIII Congresso Brasileiro de Física Médica, Porto Alegre, v. 1, p. 568-571, 2003.

CAMARGO, N. H. A.; SOARES, C.; GEMELLI, E. Elaboration and Characterization of nanostructured biocements for biomedical applications. **Materials Research**, v. 10, n. 2, p. 135-140, 2007.

CAMARGO, N. H. A.; DELIMA, S. A.; SOUZA, J. C. P.; DEAGUIAR, J. F.; GEMELLI, E.; MEIER, M. M.; VANESSA E. S. V. E.; MITTELSTADT, F. G. Synthesis and characterization of nanostructured ceramic powders of calcium phosphate and hydroxyapatite for dental applications. **Key Engineering Materials**, v. 396-398, p. 619-622, 2009.

CAMPOS, D. M. **Produção e caracterização de colágeno tipo I e de compósitos hidroxiapatita-colágeno para regeneração óssea**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

CANO, J. J. M.; PERAIRE, C. In: SASTRE, R.; AZA, S.; ROMÁN, J. S. (Eds). **Biomateriales**. Faenza: Faenza Editrice Iberica, p. 197, 2004.

CARDOSO, H. A. I.; MOTISUKE, M.; ZAVAGLIA, C. A. C. Análise da Influência de dois processos distintos de moagem nas propriedades do pó precursor e do cimento de Beta-TCP. **Cerâmica**, v. 58, p. 225-228, 2012.

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.

CAVALHEIRO, E. T. G.; IONASHIRO, M.; BREVIGLIERI, S. T.; MARINO, G.; CHIERICE, G. O. A influência de fatores experimentais em resultados de experimentos termogravimétricos. **Química Nova, Brasil**, v. 18, n. 3, p. 305-308, 1995.

CHAPPARD, D.; GUILLAUME, B.; MALLETT, R.; PASCARETTI GRIZON, F.; BASLÉ, M. F.; LIBOUBAN, H. Sinus Lift augmentation and β -TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies. **Micron**, v. 41, n. 4, p. 321–326, 2010.

CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L.; VIRKAR, A. V.; CLARKE, D. R. The tetragonal-monoclinic transformation in zirconia: lessons learned and future trends. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 92, n. 9, p. 1901–1920, 2009.

CHIEN, Y. W. Novel drug delivery systems. New York: **Marcel Dekker**, 1992.

CHEN, Y.; WANG, J.; ZHU, X. D.; TANG, Z. R.; YANG, X.; TAN, Y. F.; FAN, Y. J.; ZHANG, X. D. Enhanced effect of β -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: *in vitro* and *in vivo* evidence. **Acta Biomaterialia**, v. 11, p. 435–448, 2015.

COELHO, W. T.; FERNANDES, J.M.; VIEIRA, R. S.; THÜRMER, M. B.; SANTOS, L. A. **Modifications on the properties of a calcium phosphate cement by additions of sodium alginate**. In: IX Brazilian Symposium on Glass and Related Materials, 2012.

CORRÊA, PRICYLA. **Síntese e caracterização de nano compósitos HA/Al₂O₃ – α sol gel para aplicações na reconstrução óssea**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Tecnológicas, Joinville, 2013.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123-133, 2001.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. **Revista matéria**, v. 12, n. 1, p. 134–139, 2007.

DEL REAL, R. P.; WOLKEB, J. G. C.; VALLET-REGI, M.; JANSEN, J. A. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v. 23, p. 3673–3680, 2002.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Princípios e aplicações de análise térmica**. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 2012.

DESAI, S. J.; SINGH, P.; SIMONELLI, A. P.; HIGUCHI, W. I. Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in inert matrices III. Quantitative studies involving the polyethylene plastic matrix. **Journal of pharmaceutical sciences**. New York, v. 55, p. 1230-1234, 1966a.

DESAI, S. J.; SINGH, P.; SIMONELLI, A. P.; HIGUCHI, W. I. Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in inert matrices IV. Some studies involving the polyvinyl chloride matrix. **Journal of pharmaceutical sciences**. New York, v. 55, p. 1235-1239, 1966b

DOS SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Departamento de Engenharia de Materiais – Campinas – SP - Universidade Estadual de Campinas - UEC, p. 247, 2002.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. **Materials**, v. 2, p. 399–498, 2009.

DOROZHKIN, S. V. Self-Setting calcium orthophosphate formulations. **Journal Functional Biomaterial**, v. 4, p. 209–311, 2013.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate cements for biomedical application. **Journal Materials Science**, v. 43, p. 3028–3057, 2008.

DOWNING, D.; CLARK, J. **Estatística Aplicada**. 1ª Ed. São Paulo: Saraiva, 139p. 2000.

DRIESSENS, F. C. M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A. **Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements**. Anais. Quim. Int. ed., v. 93, p. S38-S43, 1997.

DRIESSENS, F. C. M.; BOLTONG, M. G.; MAEYER DE, E. A. P.; VERBEECK, R. M. H.; WENZ, R. Effect of temperature and immersion on the setting of some calcium phosphate cements. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 11, p. 453-457, 2000.

DRIESSENS, F.C.M.; BOLTONG, M.G.; BERMUDEZ, O.; PLANELL, J. A. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 4, p. 503-508, 1993.

DRIESSENS, F. C. M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A. **Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements**. Anais. Quim. Int. Ed., v. 93, p. S38-S43, 1997.

DUARTE, E. B. **Processamento de hidroxiapatita por microondas: síntese de pós e sinterização de peças**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

DUARTE, E. B. **Produção de nanocompósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita como rota para valorização de resíduos agroindustriais**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Materiais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

ELLIOTT, J. C. Structure and chemistry of apatite and other calcium orthophosphates. **Elsevier, Amsterdam**, p. 111, 1994.

ERMIS, D.; YUKSEL, A. Preparation of spray-dried microspheres of indomethacin and examination of the effects of coating on dissolution rats. **Journal Microencapsulation**, v. 16, p. 315-324, 1999.

FAGAGNOLO, J., B. **Estudo do processo de fabricação de materiais compósitos de matriz de alumínio por metalurgia do pó, via moagem de alta energia e extrusão**. 2000. 256f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica). Departamento de Engenharia da Fabricação. Faculdade de Engenharia Mecânica. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2000.

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: 14/10/2015.

FÁVERO, L. P.; BELFIORE, P.; TAKAMATSU, R. T. e SUZART, J. M. **Métodos quantitativos com stata: procedimentos, rotinas e análise de resultados**. Rio de Janeiro, Elsevier. 264p. 2014.

FRENKEN, J. W.; BOUWMAN, W. F.; BRAVENBOER, N.; ZIJDERVELD, S. A.; SHULTEN, E. A.; TEN, BRUGGENKATE, C. M. **The use straumann bone ceramic ina a maxillary sinus floor elevation produce: a clinical, radiological, histological and histomorphometric evaluation with a 6-month healing period**, v. 21, n. 2, p. 201-208, 2010.

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. **Journal of Controlled Release**, v. 122, p. 173-180, 2007.

GINEBRA, M. P.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. **Biomaterials**, v. 25, p. 3453–3462, 2004.

GINEBRA, M. P.; CANAL, C.; ESPANOL, M.; PASTORINO, D.; MONTUFAR, E. B. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 1090–1110, 2012.

GENG, F.; TAN, L. L.; JIN, X. X.; YANG, J. Y.; YANG, K. The preparation, cytocompatibility, and in vitro biodegradation study of pure b-TCP on magnesium. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, issue 5, p. 1149–1157, 2009.

GLEITER, H. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. **Acta Materials**, v. 48, p. 1–29, 2000.

GOMIDE, V.S. **Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos**. 2005. 142f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005.

GOUVEIA, D. S. **Obtenção de pós nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultra-som**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Autarquia associada à Universidade de São Paulo. 2008.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

HAINES, P. J. **Thermal methods of analysis**: Principles, applications and problems. London: Chapman and Hall, 286p. 1995.

HAIR, J.F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. Editora: Bookman, ed. 6, 688p. 2009.

HASSAN, M. N.; MAHMOUD, M. M.; EL-FATTAH, A. A.; KANDIL, S. Microwave-assisted preparation of nano-hydroxyapatite for bone substitutes. **Ceramics International**, v. 42, p. 3725–3744, 2016.

HAYEK, E.; NEWESLEY, H. Inorganic syntheses. **New York: McGraw Hill**, v. 7, p. 63–65, 1963.

HESARAKI, S.; NEMATI, R.; NOSOUDI, N. Preparation and characterisation of porous calcium phosphate bone cement as antibiotic carrier. **Advances in Applied Ceramics**, v. 108, p. 231–240, 2009.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to bioceramics**. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., p. 1-15, 1993.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials, Amsterdam**, 1998.

HING, K. A. Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry. **International Journal Applied Ceramic Technology**, v. 2 issue 3, p. 184–199, 2005.

IONASHIRO, M. G. **Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. São Paulo: Giz Editorial, 82p, 2004.

ISHIKAWA, K. Calcium phosphate cement. In: kokubo, Tadashi. **Bioceramics and their clinical applications**. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited, p. 438-463, 2008.

ISO 10993-5. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: **Tests for in vitro cytotoxicity**, Genève, 2009.

ISO 10993-12. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION: Biological evaluation of medical devices. Part 12: **Sample preparation and reference materials**, 4 ed, 2012.

IUPAC. **Recommendations for the characterization of porous solids**. Journal. Haber, Pure and Applied Chemistry, v. 66, n. 8. Great Britain, 1994.

JEFFERY, G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. Análise química quantitativa. Tradução de Horácio Macedo. 5.ed, Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, p. 47-51, 1992.

JINAWATH, S.; PONGKAO, D.; SUCHANEK, W.; YOSHIMURA, M. Hydrothermal synthesis of monetite and hydroxyapatite from monocalcium phosphate monohydrate. **International Journal of Inorganic Materials**, p. 997-1001, 2001.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, p. 5474–5491, 2005.

KHAIROUN, I.; BOLTONG, M. G.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A. Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement. **Biomaterials**, v.18, p. 1535-1539, 1997.

KHAIROUN, I.; BOLTONG, M. G.; DRIESSENS, F. C. M.; PLANELL, J. A. Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 9, p. 425 – 428, 1998.

KINAS, P. G; ANDRADE, H. A. **Introdução à análise bayesiana (com R)**. Editora: maisQnada, Porto Alegre, 240p. 2010.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. **Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems**. In: ROSEMAN, T.J.; MANSDORF, S.Z., (Eds.). Controlled release delivery systems. New York: Marcel Dekker Inc., 1981, p. 77-90. Materials / Science and Engineering: Springer, 2007.

KORSMEYER, R. W; LUSTIG, S. R; PEPPAS, N. A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. I. Mathematical modeling. **Journal of Polymer Science Part B. Polymer Physics**. 1986.

KUBASKI, E., T. **Efeito das variáveis de moagem e dos moinhos de alta energia sobre a síntese do composto intermetálico NiAl**. 2010. 220f. Tese (Doutorado em Engenharia) Escola Politécnica de São Paulo. Universidade de São Paulo, 2010.

KUNDU, B.; LEMOS, A.; SOUNDRAPANDIAN, C.; SEN, P. S.; DATTA, S.; FERREIRA, J. M. F.; BASU, D. Development of porous HAP and β -TCP scaffolds by starch consolidation with foaming method and drug-chitosan bilayered scaffold based drug delivery system. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, issue 11, p. 2955–2969, 2010.

KUHNE, J. H.; BARTL, R.; FRISH, B.; HAMMER, C.; JANSSON, V.; ZIMMER, M. Bone formation in corali hidroxiapatite: effects of pore size studied in rabbits. **Acta Orthopaedic**. v. 65, 1994.

KUMTA, P.N.; SFEIR, C.; LEE, D.; OLTON, D.; CHOI, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. **Acta Biomaterialia**, p. 65-83, 2005.

KWON, S.; JUN, Y.; HONG, S.; KIM, H. Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composites powders. **Journal of European Ceramic Society**, p.1039-1045, 2003.

LAKES, R. **Composite Biomaterials** – The Biomedical Engineering Handbook, Second Edition, 2000.

LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SPRIO, S. Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, p. 2377–2387, 2000.

LEGEREOS, R. Z. **Proprieties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates**. Clin Orthop Relat Res. n. 395, p. 81–98, 2002.

LEGEROS, R. Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monographs in Oral Science**, v. 15, Switzerland: Karger, 1991.

LEVINE, D. M.; STEPHAN, D. F.; KREHBIEL, T. C.; BERENSON, M. L. **Estatística: teoria e aplicações**. Livros Técnicos e Científicos Ltda, 2008.

LEWIS, G. Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: state-of-the-art review. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, p. 456–468, 2005.

LI, Z.; KAWASHITA, M. Current progress in inorganic artificial biomaterials. **Journal Artificial Organs.**, v. 14. n. 3, p. 163-170. Sep, 2011.

LINDGREN, C.; MORDENFELD, A.; HALLMAN, M. **A prospective 1-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with synthetic biphasic calcium phosphate or deproteinized bovine bone**. Clin Implant Dent Relat Res., v. 14, n. 1, p. 41-50. 2012.

LIU, C.; HE, H. Developments and applications of calcium phosphate bone cements. **Springer Series in Biomaterials Science and Engineering**, v. 9, p. 43, 2017.

MARDAS, N.; D' AIUTO, F.; MEZZOMO, L.; ARZOUMANIDI, M.; DONOS, N. **Radiographic alveolar bone changes following ridge preservation with two different biomaterials.** Clin Oral Implants Res., v. 22, n. 4, p. 416-23. Apr, 2011.

MARIÑO, M.; TORRES, J.; TRESGUERRES, I.; JEREZ, L. B.; CABARCOS, E. L. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 81A, Issue 1, p. 93–102, 2007.

MATSUSHIMA, A.; KOTOBUKI, N.; TADOKORO, M.; KAWATE, K.; YAJIMA, H.; TAKAKURA, Y.; OHGUSHI, H. In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on beta-tricalcium phosphate. **Artificial Organs**, v. 33, n. 6, p. 474-81. Jun. 2009.

MIYAMOTO, Y.; ISHIKAWA, K.; FUKAO, H.; SAWADA, M.; NAGAYAMA, M.; KON, M.; ASAOKA, K. *In vivo* setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement. **Biomaterials**, v. 16, p. 855-660, 1995.

NACHIONDO, J. M.; POSER, R. D.; GOODMAN, S. B.; CONSTANTZ, B. R. **Antibiotic impregnation of a resorbable calcium phosphate cement.** En: Proceedings of the 20th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Boston, p. 146, 1994.

NOZAKI, A. C. M.; MARQUES, R. F. C.; DINIZ, I. M. A.; MARQUES, M. M.; MARCHI, J. **Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial.** In: 7º Congresso Latino Americano e de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal, RN, Agosto de 2012.

O'BRIEN, M.; MCCAULEY, J.; COHEN, E. **Indomethacin analytical profiles of drug substances**, v. 13, p. 211-238, 1984.

OH, S.H.; PARK, I. K.; KIM, J. M.; LEE, J. H. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. **Biomaterials, Amsterdam**, 2007.

OLIVEIRA, M. **Síntese e caracterização de biomateriais à base de fosfato de cálcio.** 2004. 104f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas, área de concentração em Ciência e Engenharia de Materiais). Belo Horizonte: Escola de Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.

OLIVEIRA, F. P. **Influência do processamento na obtenção de biocerâmicas à base de hidroxiapatita.** Dissertação (Mestrado em Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.

ORÉFICE R. L.; PEREIRA M. M.; MANSUR H. S. **Biomateriais- Fundamentos e Aplicações.** Ed.Cultura Médica, Rio de Janeiro, 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. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 3500-3502, 1990.

OGAWA, C. A.; PLEPIS, A. M. Liberação *In Vitro* de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita: colágeno. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 2, p.115-122, 2002.

OPRITA, E. I.; MOLDOVAN, L.; CRACIUNESCU, O.; BUZGARIU, W.; TARDEI, C.; ZARNESCU, O. **A bioactive collagen- β tricalcium phosphate scaffold for tissue engineering**. Central European Journal of Biology, v. 2, issue 1, p. 61–72, 2006.

OTSUKA, M.; YOSHIHISA, M.; YOSHIKO, S.; JEFFREY, L. F.; HIGUCHI, W. I. A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 2. physicochemical properties and drug release rate of the cement-containing Indomethacin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 83, n. 5, p. 611–615, 1994.

OTSUKA, M.; NAKAHIGASHI, Y.; MATSUDA, Y.; FOX, J. L.; HIGUCHI, W. I.; SUGIYAMA, Y. Effect of geometrical cement size on in vitro and in vivo indomethacin release from self-setting apatite cement. **Journal of Controlled Release**, v. 52, p. 281–289, 1998.

OTSUKA, M.; MATSUDA, Y.; WANG, Z.; FOX, J. L.; HIGUCHI, W. I. Effect of sodium bicarbonate amount on in vitro indomethacin release from self-setting carbonated-apatite cement. **Pharmaceutical Research**. v. 14, p. 444–449, 1997.

PARK, Y.M.; RYU, S.Y.; STEVENS, R.; PARK, H.C. Preparation of whisker shaped hydroxyapatite / β -tricalcium phosphate composite. **Materials Chemistry and Physics**, 2007. doi:10.1016 /j.matchemphys. 13.12.2007.

PAUW, B. R.; KÄSTNER, C.; THÜNEMANN, A. F. **Nanoparticle size distribution quantification: results of a SAXS inter-laboratory comparison**. ARXIV: 1702.03902 (physics.data-an), 2017.

PEITL FILHO, O. **Vitro-cerâmica bioativa de alto desempenho mecânico**. 1995. TESE (DOUTORADO) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 1995.

PENG, J.; WEN, C.; WANG, A.; WANG, Y.; XU, W.; ZHAO, B.; ZHANG, L.; LU, S.; QIN, L.; GUO, Q.; DONG, L.; TIAN, J. Micro-CT-based bone ceramic scaffolding and its performance after seeding with mesenchymal stem cells for repair of load-bearing bone defect in canine femoral head. **Journal Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials**, v. 96, n. 2, p. 316-25. Feb. 2011.

PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian non-Fickian drug release from polymers, **Pharm. Acta Helv.**, v. 60, p. 110, 1985.

PETROV, O. E.; DYULGEROVA, E.; PETROV, L.; POPOVA, R. Characterization of calcium phosphate phases obtained during the preparation of sintered niphase Ca-P ceramics. **Materials Letters**, v. 48, p. 162-167, 2001.

PIORINO NETO, F. **Estudo do ensaio de anel em compressão diametral para caracterização de cerâmicas em temperaturas ambiente e elevadas**. 2000. 162f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Faculdade de Engenharia Química, Lorena. RANADE, V.; Drug Delivery Systems. 2. ed. London: CRC Press, 2003.

PITHON, M. M.; SANTOS R. L.; RUELLAS, A. C. O.; FIDALGO, T. K. S.; ROMANOS, M. T. V.; MENDES, G.V. Citotoxicidade in vitro de elásticos ortodônticos: comparação entre duas metodologias. **Revista Saúde.Com.** v. 4, n. 1, p. 19-26. 2008.

PITTET, C.; LEMAÎTRE, J. Mechanical characterization of brushite cements: a mohr circles approach. **Journal of Biomedical Materials Research (Appl Biomater)**, v. 53, p. 769–780, 2000.

RATIER, A.; FRECHE, M.; LACOUT, J. L.; RODRIGUEZ, F. Behaviour of an injectable calcium phosphate cement with added tetracycline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p. 261–268, 2004.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**. San Diego, Academic Press, 1996.

RATNER, B. D. **In Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine**. ed. Ratner, B. D; Hoffman, A.; Schoen, F.; Lemons, J. 2nd. ed. Elsevier academic press, San Diego, p. 355, 2004.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; ASSOLANT, D. B.; THOMAS, P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. **Biomaterials**, v. 23, issue 4, p. 1065–1072, 2002.

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.

REDY, S.; WASNIK, S.; GUHA, A.; KUMAR, J. M.; SINHA, A.; SINGH, S. Evaluation of nano-biphasic calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering applications: In vitro and preliminary in vivo studies. **Journal Biomaterials Applied**, v. 27, n. 5, p. 565-75. Jan. 2013.

REHMAN, M. U.; JAWAID, P.; KONDO, T. Dual effects of nanoparticles on radiation therapy: as radiosensitizers and radioprotectors. **Radiation Environment and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 40–45, 2016.

RENAUDIN, G.; GOMES, S.; NEDELEC, J. M. First-Row transition metal doping in calcium phosphate bioceramics: A Detailed Crystallographic Study. **Materials**, v. 10, issue 1, p. 92, 2017.

REYNOLDS, J. E. F. **Martindale the extra pharmacopeia**. (Ed.) Londres, Pharmaceutical Press, 30. ed., 1993.

RIETVELD, H. M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures, **Journal Applied Crystallography**, v. 2, p. 65–71, 1969.

RIBEIRO, C. **Processamento e caracterização de cerâmicas a base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico**. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de

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

RICHERSON, D. W. **Modern ceramic engineering**. Properties, Processing and Use in Design. 2. ed. Editora Marcel Dekker, 1992.

ROBERTS I. I. L. J. e MORROW, J. D. **Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout** In: Hardman J. C.; Limbird, L. E.; Gilman A. G., eds. Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10. ed. New York: McGraw-Hill, p. 687–731, 2001.

RÖDEL, J.; KOUNGA, A. B. N.; WEISSENBERGER-EIBL, M.; KOCH, D.; BIERWISCH, A.; ROSSNER, W.; HOFFMANN, M. J.; DNAZER, R.; SCHNEIDER, G. **Development of a road map for advanced ceramics**, p. 2010-2025. J. Eur. Ceram. Soc., 2008.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317–320, 2003.

RUNOWSKI, M.; LIS, S., **Nanocrystalline rare earth fluorides doped with Pr³⁺ ions**. **Journal of rare earths**, v. 34, n. 8, p. 802, 2016.

RYU, H. S.; YOUN, H. J.; HONG, K. S.; CHANG, B. S.; LEE, C. k.; CHUNG, S. S. An Improvement in Sintering Property of α - tricalcium phosphate by Addition of Calcium Pyrophosphate. **Biomaterials**, v.23, n.14, p. 909 – 914, 2002.

SANTANA, J. G. A. **Desenvolvimento de cerâmicas multicamadas de carbeto de silício destinadas a aplicações térmicas**. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica na Área de Projetos e Materiais) - Universidade Estadual Paulista, UNESP. 2010.

SANTOS, E. A.; BARREIRA PINTO, V. B. **Materiais Cerâmicos**. In: Granjeiro JM, Soares GDA. Biomateriais em Odontologia. 1. ed. São Paulo: VM Cultural, p. 57-68, 2011.

SANTOS, L. M. **Dinâmica de matéria orgânica e destino de metais pesados em dois solos submetidos à adição de lodo de esgoto**. 2006. 142f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 2006.

SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. 274f. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, 2002.

SARGIN, Y.; KIZILYALLI, M.; TELLI, C.; GÜLER, H. **A new method for the solid-state synthesis of tetracalcium phosphate, a dental cement: X-ray powder diffraction and IR studies**. v. 17, issue 7, p. 963–970, 1997.

SCHMALZ, G.; BROWNE, R. M. **INTERN. DENTAL J**, v. 45, p. 275-278, 1995.

- SCHMITT, C. M.; DOERING, H.; SCHMIDT, T.; LUTZ, R.; NEUKAM, F.; SCHLEGEL, K. A. **Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic®, Bio-Oss®, Puros® and autologous bone.** A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*13, 2012.
- SCHWARTZ, B. J.; SIMONELLI, A. P.; HIGUCHI, W. I. Drug release from wax matrices I - Analysis of data with first-order kinetics and with the diffusion-controlled model. **Journal Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 57, p. 274-277, 1968a.
- SCHWARTZ, B. J.; SIMONELLI, A. P.; HIGUCHI, W. I. Drug release from wax matrices II - application of a mixture theory to the sulfanilamide-wax system. **Journal Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 57, p. 278-282, 1968b.
- SENA, L. A. de. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colageno para aplicações biomédicas.** Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE, UFRJ. 2004.
- SHAYESTEH, Y. S.; KHOJASTEH, A.; SOLEIMANI, M.; ALIKHASI, M.; KHOSHZABAN, A.; AHMADBEIGI, N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. **Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 106, n. 2, p. 203-209. Aug, 2008.
- SILVERTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- SOLOTEST, Catálogos. Disponível em: <<http://www.solotest.com/catalogos/C6.PDF>>. Acesso em: 01 julh. de 2015.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental,** 5. ed., Porto Alegre: Bookman, 2002.
- SOARES, C. **Síntese e caracterização de biocimentos nanoestruturados para aplicações biomédicas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Joinville, SC –Universidade do Estado de Santa Catarina- UDESC - DECM, 91p. 2006.
- STANLEY, P. Mechanical strength testing of compacted powders. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 227, n. 1-2, p. 27-38, Oct. 2001.
- SURYANARAYANA, C. Mechanical alloying and milling. **Progress in Materials Science,** v. 46, p.1-184, 2001.
- TAKECHI, M.; MIYAMOTO, Y.; ISHIKAWA, K.; TOH, T.; YUASA, T.; NAGAYAMA, M.; SUZUKI, K. Initial histological evaluation of anti-washout type fast-setting calcium phosphate cement following subcutaneous implantation. **Biomaterials,** v. 19, p. 2057-2063, 1998.
- TAKECHI, M.; MIYAMOTO, Y.; MOMOTA, Y.; YUASA, T.; TATEHARA, S.; NAGAYAMA, M.; ISHIKAWA, K.; SUZUKI, K. The in vitro antibiotic release from anti-washout apatite cement using chitosan. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine,** v. 13, Issue 10, p. 973–978, 2002.

- TAKYA, C. M.; GRANJEIRO, J. M.; MAIA, M. D. C. **Avaliação da compatibilidade biológica de biomateriais – ensaio in vivo**. In: Granjeiro JM, Soares GDA, editors. *Biomateriais em Odontologia*. 1. ed. São Paulo: VM Cultural, p. 167-177, 2011.
- TAN, J.; SALTZMAN, W.M. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. **Biomaterials**, v. 25, p. 3593-3601, 2004.
- TORRESA, P. M. C.; ABRANTES, J. C. C.; KAUSHALA, A.; PINAA, S.; DÖBELINC, N.; BOHNER, M.; FERREIRA, J. M. F. Influence of Mg-doping, calcium pyrophosphate impurities and cooling rate on the allotropic $\alpha \leftrightarrow \beta$ – tricalcium phosphate phase transformations. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 36, p. 817–827, 2016.
- VALLET-REGÍ M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphate as substitution of bone tissues. **Progress in solid State Chemistry**, v. 32, p. 1-31, 2004.
- VALLET-REGÍ, L. M.; RODRÍGUEZ-LORENZO. A. J. Synthesis and characterization of calcium deficient apatite. **Revista: Solid State Ionics**, v. 101-103, p. 1279-1285, Salinas, 1997.
- VALLET REGÍ, M.; RUIZ HERNÁNDEZ, E. Bioceramics: from bone regeneratio to cancer nanomedicine. **Advanced Materials**, v. 23, n. 44, p. 5177-5218, 2011.
- VIEIRA, S. **Análise de Variância (ANOVA)**. Editora Atlas, São Paulo, 2006.
- WAKIMOTO, M.; UENO, T.; HIRATA, A.; LIDA, S.; AGHALOO, T.; MOY, P. K. **Histologic evaluation of human alveolar sokets treated with an artifice, al bone substitute material**. *J Craniofac Surg.*, v. 22, n. 2, p. 490-3. Mar. 2011.
- WANG, L.; NANCOLLAS, G. H. Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. **Chemical Reviews.**, v. 108, n. 11, p. 4628–4669, 2008.
- WANG, Y.; ZHANG. S.; WEI, K.; ZHAO, N.; CHEN, J.; WANG, X. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template. **Materials Letters**, v. 60, p.1484–1487, 2006.
- WANG, C. J.; CHEN, T. Y.; ZHANG, J.; LIU, C. S. **An in vivo study of tobramycin-impregnated calcium phosphate cement as an artificial bone material repairing bone defect**. *Fudan Univ. J. Med. Sci.* v. 28, p. 473–475, 2001.
- WENDLANDT, W. W. **Thermal Analysis**. Toronto: John Wiley & Sons, 3. ed, 814p, 1986.
- WILHELMUS, K.R. **SURV. OPHTHALMOL.** v. 45, n. 5, p. 493, 2001.
- WILLIAMS, D.F. **Dictionary of biomaterials**: liverpool university press, p. 42, 1999.
- XINGDONG, Z.; YUBAO, L.; PING, Z.; CONG, W.; MUTANG, W. **Porous HA ceramics as oral and maxillofacial prostheses**. In: Trusu H. editor. *Advanced prosthodontics worldwide*. Hiroshima: WCP. v. 91, p. 578-81, 1991.

- YANG, S.; LEONG, K. F.; DU, Z.; CHU, C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. **Tissue Engineering**. New Rochelle, 2002.
- YUAN, H.; FERNANDES, H.; HABIBOVIC, P.; DE BOER, J.; BARRADAS, A. M.; DE RUITER, A.; WALSH, W. R.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE BRUIJIN, J. D. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n. 31, p. 136-149. Aug, 2010.
- YOSHIMURA, H. N.; MOLISANI, A. L.; SIQUEIRA, G. R.; DE CAMARGO, A. C.; NARITA, N. E.; CESAR, P. F.; GOLDENSTEIN, H. Efeito da porosidade nas propriedades mecânicas de uma alumina de elevada pureza. **Cerâmica**, São Paulo. v. 51, n. 319, p. 239-251, jul./set. 2005.
- ZAVAGLIA, F. C. **Síntese, caracterização e processamento de beta fosfato Tricálcico para manufatura de implantes personalizados**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011.
- ZIMMERMANN, F. J. P. **Estatística aplicada à pesquisa agrícola**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 402p. 2004.
- ZHANG, F.L.; WANG, C.Y.; ZHU, M. Nanostructured Wc/Co composite powder prepared by high energy ball milling. **Scripta Materialia**, v. 49, p. 205-216, abr. 2003.
- ZOU, C.; WENG, W.; DENG, X.; CHENG, K.; LIU, X.; DU, P.; SHEN, G.; HAN, G. Preparation and characterization of porous β -tricalcium phosphate/collagen composites with an integrated structure. **Biomaterials**, v. 26, issue 26, p. 5276 – 5284, 2005.

APÊNDICE A – TESTE DE HOMOGENEIDADE DA VARIÂNCIA DOS BIOCIMENTOS (TESTE DE LEVENE).

Tabela A1 – Teste de Levene correspondente a resistência a compressão diametral dos biocimentos com adição de fosfato de cálcio.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Soma de Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)	Razão entre QM (F)	<i>p</i> -valor
Varição entre tratamentos	4	0,0042	0,00105	3,55779	0,06712
Varição dentro de cada tratamento (erro)	10	0,00295	2,94815E-4		

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base na Tabela A1, o *p*-valor é maior que o valor α especificado (0,05). Observa-se não existem diferenças significativas entre as cinco variâncias, ou seja, é razoável pressupor que as concentrações das cinco formulações produzem resistência com igual quantidade de variabilidade.

Tabela A2 – Teste de Levene correspondente ao tempo inicial de pega dos biocimentos sem e com a incorporação do fármaco

Fonte de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Soma de Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)	Razão entre QM (F)	<i>p</i> -valor
Varição entre tratamentos	1	6E – 4	6E – 4	0,06283	0,81443
Varição dentro de cada tratamento (erro)	4	0,0382			

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela A3 – Teste de Levene correspondente ao tempo final de pega dos bicimentos sem e com a incorporação do fármaco

Fonte de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Soma de Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)	Razão entre QM (F)	<i>p</i> -valor
Varição entre tratamentos	1	0,54803	0,54803	1,54916	0,2812
Varição dentro de cada tratamento (erro)	4	1,41504	0,35376		

Fonte: Elaborada pela autora.

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 A4 – Teste de Levene correspondente a resistência a compressão diametral dos biocimentos com e sem adição do fármaco

Fonte de Variação	Grau de Liberdade (GL)	Soma de Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)	Razão entre QM (F)	<i>p</i> -valor
Varição entre tratamentos	1	6,22963E-5	6,22963E-5	3,55779	0,68639
Varição dentro de cada tratamento (erro)	4	0,00132	3,30093E-4		

Fonte: Elaborada pela autora.

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

ANEXO A – MODELOS MATEMÁTICOS DE HIGUCHI E DE KORSMEYER-PEPPAS

Higuchi elaborou alguns modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes sólidas e semi-sólidas. A equação de Higuchi foi primeiramente aplicada para sistemas planares, sendo depois modificada para considerar diferentes geometrias dos sistemas matriciais. O modelo de Higuchi é um modelo aproximado e fundamentado na lei de Fick. Esse modelo assume que o fármaco na camada superficial do sistema dilui na matriz e difunde-se para fora da mesma. Quando o teor do agente na superfície acaba, a próxima camada começa a esgotar. A cinética de liberação é descrita então, pela equação de Higuchi (Eq. A1), 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 e LOBO, 2001).

$$M_t = Kt^{1/2} \quad (A1)$$

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

Desta forma, o 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 facilitar a análise dos dados de sistemas de várias geometrias, uma expressão empírica exponencial foi desenvolvida para relacionar a liberação fracional do fármaco com o tempo de liberação (Eq. A2). Esse modelo é conhecido como o de Korsmeyer-Peppas, também chamado lei da potência (COSTA e LOBO, 2001).

$$\frac{M_t}{M_0} = Kt^n \quad (A2)$$

Onde, M_t/M_0 representa a liberação fracionada 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 e LOBO, 2001). A lei de potência aplica-se até 60% da quantidade total do fármaco liberado. Prediz que a liberação fracionada 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 A2 podem ser obtidos a partir da equação A3.

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_0}\right) = \ln K + n \ln t \quad (\text{A3})$$

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 A5). Um padrão que não segue a lei de Fick ($0,5 < n < 1$) é observado quando a proporção de penetração do solvente e a liberação do fármaco estão num mesmo patamar.

Tabela A5 - Relação entre o valor n e o mecanismo de liberação controlada

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

Fonte: PEPPAS, 1985.