



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS**  
**MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE MATERIAIS**

**ELAYNE VALÉRIO CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOCOMPÓSITOS PARA APLICAÇÃO EM**  
**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

**FORTALEZA**

**2013**

ELAYNE VALÉRIO CARVALHO

DESENVOLVIMENTO DE NANOBIOCOMPÓSITOS PARA APLICAÇÃO EM  
SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida  
Fechine.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- C322d Carvalho, Elayne Valério.  
Desenvolvimento de nanobiocompósitos para aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos / Elayne Valério Carvalho. – 2013.  
78 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Ciência de Materiais, Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Biomateriais.  
Orientação: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine.
1. Durapatita. 2. Sinvastatina. 3. Materiais biocompatíveis. I. Título.

---

CDD 620.11|



Universidade Federal do Ceará

Centro de Tecnologia

Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais

---

**PARECER DA COMISSÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ELAYNE VALÉRIO CARVALHO**

**Desenvolvimento de nanobiocompósitos para aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos**

A Comissão de Dissertação de Mestrado composta pelos professores, Pierre Basílio Almeida Fachine, Presidente e Orientador, da Universidade Federal do Ceará; Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira, da Universidade Federal do Ceará; Marco Antônio Botelho Soares, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará e Karlo David Alves Sabóia da Universidade Estadual do Ceará, considera a candidata:

**APROVADA**

**NÃO APROVADA**

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais da Universidade Federal do Ceará, em 29 de julho de 2013.

Prof. Pierre Basílio Almeida Fachine

Presidente e Orientador

Prof. Ricardo Emílio F.Q. Nogueira

Membro

Prof. Marco Antônio Botelho Soares

Membro

Prof. Karlo David Alves Sabóia

Membro

A Deus.

## AGRADECIMENTOS

Uma dissertação de mestrado é resultado de muita dedicação e esforço. Embora assinada por um autor, é fruto do trabalho de várias pessoas a quem devo gratidão. Primeiramente, agradeço a Jeová Deus, por suas maravilhosas provisões que me permitiram perseverar tendo a mentalidade segundo o espírito. Grande parte deste trabalho se deveu à orientação do professor Pierre Basílio Almeida Fachine, que mostrou paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desse projeto e que, ao longo destes dois anos, transcendeu o papel de educador e pesquisador, mostrando-se também um grande amigo. Ao mesmo tempo, não poderia deixar de expressar minha gratidão à professora Elisane Longhinotti pela disponibilidade e sugestões que aprimoraram esse trabalho. Agradeço também ao professor Antoninho Valentini que, gentilmente, abriu por várias vezes espaço em seu laboratório para realização de longos testes. Estendo os agradecimentos também a importante colaboração das professoras Nágila Ricardo e Regina Célia para a conclusão desse projeto. Os colegas do GQMat (Davino, Tiago, Jéssica, Yale, Paulo, Rafael, Victor, Eduardo, Manuela, Wesley, Denis, Anderson e Natália) e do Langmuir (Bárbara, Luanna, Sebastião, Moacir e Erandir), muitos dos quais são hoje grandes amigos, têm o crédito como parceiros no desenvolvimento deste trabalho nas mais variadas etapas, desde os momentos descontraídos até os exaustivas testes em que precisei de ajuda. Pude também contar com a ajuda providencial dos técnicos que realizaram as análises fundamentais para a conclusão desse trabalho, em especial, Tereza, Leandro, Nádia, Elis e Joel. Nada disso faria sentindo sem minha família - meus pais, minha irmã e meu namorado - que me apoiaram sempre. Meus agradecimentos também à CAPES pela contribuição financeira com a manutenção das bolsas de auxílio.

“Não tenhas medo, pois estou contigo. Não olhes em volta, pois eu sou teu Deus. Vou fortificar-te. Vou realmente ajudar-te. Vou deveras segurar-te firmemente com a minha direita de justiça.”

(Isaías 41:10)

## RESUMO

Nos últimos vinte anos, o campo de biomateriais à base de fosfato de cálcio tem crescido rapidamente, desempenhando um papel-chave como substituinte ósseo. A hidroxiapatita (HA) apresenta semelhança química e estrutural com a fase mineral dos ossos e dos dentes, é biocompatível e osteocondutiva, tem excelente afinidade química e biológica com os tecidos ósseos e tem aplicações biomédicas importantes como preenchimento de defeitos ósseos e em “scaffolds” na engenharia de tecidos. Nanocristais de HA foram sintetizados com sucesso por co-precipitação e via hidrotérmica. Para a caracterização estrutural, tamanho e morfologia das fases obtidas foram utilizadas técnicas de Difração de Raios-x (DRX), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Adsorção/dessorção de N<sub>2</sub>, Potencial Zeta (PZ) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Estruturas mesoporosas foram obtidas com diâmetros de poros variando entre 12 e 31 nm. Os nanocristais de HA apresentaram uma morfologia definida, em forma de bastão, e foram incorporadas a um polímero para formação de um “scaffold”. A droga sinvastatina (SINV), que influencia a regeneração óssea quando aplicada localmente, foi associada aos biocompósitos obtidos. A caracterização dos “scaffolds” foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

**Palavras chave:** Hidroxiapatita; Scaffold; Sinvastatina; PEG 6000.



## ABSTRACT

In the last twenty years, the field of biomaterials based on calcium phosphates has grown rapidly, playing a key role as a bone substituent. Hydroxyapatite has chemical and structural similarity to the mineral phase of bone and teeth, is biocompatible and osteoconductive. It has excellent chemical and biological affinity with the bone tissue and important biomedical applications such as filling bone defects and scaffolds in tissues engineering. Hydroxyapatite nanocrystals were successfully synthesized by co-precipitation and hydrothermal route. X-ray diffraction, Fourier-transform infrared spectroscopy, N<sub>2</sub> adsorption/desorption, Zeta Potential and Transmission Electron Microscopy were used to structural characterization, size and morphology of the nanoparticles. Mesoporous structures were obtained with pore diameters ranging from 12 to 31 nm. The nanoparticles showed a rod-shaped morphology and were incorporated into a polymer to form a scaffold. The drug simvastatin, which influences bone regeneration when locally applied, was associated with the biocomposite. The characterization of the scaffolds was performed by Scanning Electron Microscopy.

**Keywords:** Hydroxyapatite; Scaffold; Simvastatin; PEG 6000.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Rede cristalina da hidroxiapatita.....	7
Figura 2 - Estrutura da quitosana.....	10
Figura 3 - Micrografias de biomateriais em “scaffolds” como suporte para a fixação de células e formação de tecidos. ....	12
Figura 4 - Estrutura química da sinvastatina. ....	13
Figura 5 - Padrões de DRX obtidos para amostras de hidroxiapatita sintetizadas por diferentes tempos de tratamento hidrotérmico. ....	21
Figura 6 - Relação entre tempo de tratamento hidrotérmico e tamanho de partícula.....	23
Figura 7 - Gráficos de Williamson-Hall para as amostras de HA sintetizadas. ....	25
Figura 8 - Espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras HA0h (a), HA 1h (b), HA 2h (c), HA 4h (d) e HA 5h (e).....	26
Figura 9 - Isotermas de adsorção de nitrogênio e curvas de distribuição de tamanhos de poros das amostras de HA. ....	30
Figura 10 - Micrografias (MET) das nanopartículas sem tratamento (A), hidrotermicamente tratadas em solução NH <sub>4</sub> Cl por 2h (B) e 5 h (C) e seus respectivos gráficos de distribuição de tamanho de partícula.....	33
Figura 11 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da sinvastatina.....	34
Figura 12 - FTIR da sinvastatina recristalizada.....	35
Figura 13 - Curva DSC da sinvastatina em atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10°C/min.....	36
Figura 14 - Testes de adsorção na superfície da HA variando a concentração de sinvastatina: (a) 500 µg.mL <sup>-1</sup> , (b) 1000 µg.mL <sup>-1</sup> e (c) 2000 µg.mL <sup>-1</sup> .....	38
Figura 15 - Diâmetro médio da molécula de sinvastatina. ....	39
Figura 16 - Representação esquemática dos grupos funcionais da superfície da HA. ....	40
Figura 17 - Interação HA-SINV com base em cálculos teóricos: HA 0h (A), HA 1h (B), HA 2h (C) e HA 4h (D).....	41
Figura 18 - Relação da interação da sinvastatina com a superfície de HA. ....	42
Figura 19 - Comparativo de massa (mg) de SINV por massa (g) de HA 5h para testes de adsorção com soluções com concentrações de 500, 1000 e 2000 µg.ml <sup>-1</sup> . ....	42
Figura 20 - FTIR da HA 5h com SINV adsorvida em sua superfície. ....	43
Figura 21 - TG e DTG de HA 5h (A) e HA-SINV (B). ....	44
Figura 22 - Representação esquemática do sistema HA-AO-SINV.....	45

Figura 23 - FTIR das amostras HA 5h e HA 5h-AO.....	46
Figura 24 - FTIR do ácido oleico puro. ....	46
Figura 25 - TG das amostras HA 5h e HA 5h-AO .....	47
Figura 26 - DTG da amostra HA-AO.....	48
Figura 27 - Porcentagem de SINV incorporada em HA-AO para soluções com diferentes concentrações de sinvastatina.....	49
Figura 28 - Comparativo de massa (mg) de SINV por massa (g) de HA-AO para testes de incorporação com soluções de diferentes concentrações. ....	49
Figura 29 - FTIR do sistema HA-AO-SINV. ....	50
Figura 30 - TG e DTG do sistema HA-AO-SINV. ....	51
Figura 31 - Curvas de TG para HA, HA-SINV e HA-AO-SINV.....	51
Figura 32 - Micrografias das amostras HA 5h-SINV (a) e HA 5h-AO-SINV (b). ....	52
Figura 33 - Micrografia e EDS dos “scaffolds” preparados: apenas o PEG/QUIT (A), PEG/QUIT com HA (B) e PEG/QUIT com HA-SINV (C). ....	54
Figura 34 - MEV do “scaffold” com HA e EDS da região em vermelho. ....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados dos parâmetros estruturais refinados pelo método de Rietveld para as amostras de HA. ....	22
Tabela 2 - Modos vibracionais nos espectros do infravermelho obtidos para as amostras de HA. ....	28
Tabela 3 - Bandas de absorção na região do infravermelho da hidroxiapatita .....	29
Tabela 4 - Resumo das análises de adsorção/dessorção de nitrogênio.....	31
Tabela 5 - Potencial Zeta das amostras sintetizadas.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO	Ácido Oleico
BET	Brunauer Emmett Teller
BJH	Barrt Joyner Halenda
DFT	Density Functional Theory
DRX	Difração de Raios-x
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EDS	Espectroscopia de Dispersão de Energia
HA	Hidroxiapatita
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NP	Nanopartículas
PEG	Polietilenoglicol
PZ	Potencial Zeta
QUIT	Quitosana
SINV	Sinvastatina
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS .....	4
2.1 Objetivos gerais .....	4
2.2 Objetivos específicos .....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1 Biomateriais .....	5
3.2 HA.....	6
3.2.1 Estrutura e propriedades .....	6
3.2.2 Métodos de obtenção .....	8
3.2.3 Aplicações .....	9
3.3 Biopolímeros.....	10
3.3.1 Quitosana.....	10
3.3.2 Polietilenoglicol (PEG) .....	11
3.4 Biocompósitos .....	11
3.5 “Scaffolds” .....	12
3.6 Sinvastatina.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
4.1 Desenvolvimento dos nanobiocompósitos .....	15
4.1.1 Síntese da HA via tratamento hidrotérmico .....	15
4.1.2 Extração da sinvastatina de cápsulas farmacêuticas.....	15
4.1.3 Adsorção de sinvastatina na superfície da hidroxiapatita.....	15
4.1.4 Modificação da superfície da hidroxiapatita com ácido oleico (AO).....	16
4.1.7 Preparo dos “scaffolds” de Quitosana e PEG com HA .....	16
4.1.8. Ensaio teóricos .....	16
4.2 Caracterização .....	17
4.2.1 Difração de raios-x .....	17
4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho.....	17
4.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	17
4.2.4 Adsorção/dessorção de nitrogênio.....	18
4.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial .....	18
4.2.7 Análise Térmica.....	19

4.2.9 Potencial Zeta .....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
5.1 Caracterização das nanopartículas de HA .....	20
5.1.1 Difração de raios-x .....	20
5.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho.....	25
5.1.3 Estimativa da área de superfície específica por estudos de adsorção/dessorção de N <sub>2</sub> ...	29
5.1.4 Potencial Zeta .....	31
5.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão.....	32
5.2 Caracterização da sinvastatina.....	34
5.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta .....	34
5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho.....	35
5.3 Adsorção da sinvastatina na superfície da HA.....	38
5.4 Modificação da superfície da HA com ácido oleico .....	44
5.5 Incorporação da sinvastatina em HA-AO.....	48
5.6 Biocompósito.....	53
6 CONCLUSÃO .....	56
7 PERSPECTIVAS .....	57
8 PUBLICAÇÕES NO PERÍODO DE MESTRADO .....	58
8.1 Artigo Submetido.....	58
8.2 Trabalhos/resumos publicados em anais de congresso .....	58
REFERÊNCIAS .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

Diante do aumento da expectativa de vida da população mundial, doenças relacionadas à estrutura óssea tornaram a ortopedia um dos setores de grande demanda. Assim, a necessidade de desenvolvimento de novos materiais utilizados para a substituição e regeneração óssea, classificados como biomateriais, tem ganhado grande importância no campo biomédico (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A aplicação desses biomateriais na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos, é relevante, pois eles não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente. Podem ainda ser de fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo que permitem e estimulam a formação óssea (OLIVEIRA, L. S. A. F. et al., 2010)

Na área de biomateriais, a hidroxiapatita é o material de referência e o principal fosfato de cálcio usado para reconstrução óssea rápida. Biocerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio, sintéticos e naturais, se apresentam hoje como um dos principais materiais empregados na medicina e odontologia. São usadas para a reparação de perdas de tecido ósseo por apresentarem características físicas, químicas e biológicas que estimulam uma resposta adequada do tecido vivo (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). A HA, além de apresentar estrutura cristalina e razão Ca/P similares ao do componente mineral do tecido ósseo, exibe excelente biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade, permitindo a proliferação de células ósseas (fibroblastos e osteoblastos) as quais não a distinguem da superfície do osso. Essa biocerâmica apresenta também ausência de toxicidade local e sistêmica, ausência de respostas inflamatórias, aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro e hidrofiliabilidade (NASCIMENTO, 2009). Estas propriedades somadas a sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da HA um excelente suporte para ação prolongada de drogas (COSTA, A. C. F. D. M. et al., 2009).

A vasta aplicação desse promissor biomaterial tem promovido o desenvolvimento de vários métodos de síntese de cristais de HA resultando em produtos com diferentes características e propriedades (YANG et al., 2012). Entre esses produtos, destacam-se as nanopartículas (NP) que têm sido desenvolvidas ou adaptadas de forma a obter propriedades superiores, uma vez que os materiais se comportam de forma muito diferente em nanoescala em comparação com escalas maiores (ALTAVILLA; CILIBERTO, 2010). Portanto, a nanotecnologia tem o potencial de beneficiar significativamente o desenvolvimento de hidroxiapatita aplicada à biomedicina. Como resultado, pós nanocristalinos de HA exibem



melhor sinterização, compressão, resistência à tração (WANG et al., 2010; ZHOU; LEE, 2011) e, devido a maior área superficial, espera-se melhor bioatividade.

Para aplicações biológicas é importante que os cristais sejam monodispersos (WANG et al., 2010), com morfologia e tamanho de partícula bem definidos e controlados (ZHANG et al., 2009). Consequentemente, a biotividade, biocompatibilidade, estabilidade e propriedades mecânicas da HA são determinadas por sua morfologia, tamanho do cristalito, composição e estrutura. (ZHANG et al., 2009). Surge, portanto, a necessidade de uma metodologia de síntese para HA que permite o controle das propriedades dos cristais - especialmente, da morfologia e do tamanho de partícula - a fim de produzir um material mais semelhante possível ao encontrado na matriz óssea, permitindo o desenvolvimento de biomateriais avançados com aplicações em vários setores, especialmente de engenharia tecidual e liberação de drogas. A síntese hidrotérmica revela-se o método mais viável com nanocristais de HA monodispersos e com diferentes morfologias e tamanhos de partícula (WANG et al., 2010).

Alguns autores relataram que o uso de HA associada a biopolímeros (macromoléculas derivadas de seres vivos que possuem unidades repetitivas na cadeia (BRANT, 2008) ) levaram a um material com melhores propriedades mecânicas (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003). Isso porque, ao se combinar dois ou mais materiais diferentes, pode-se obter um material compósito cujas propriedades são superiores, ou melhores, em alguns aspectos, às propriedades de cada um dos componentes (SMITH, 1998). Portanto, torna-se interessante a obtenção de esponjas poliméricas com cerâmicas fosfatadas para obtenção de um novo biomaterial com estrutura similar ao do tecido ósseo natural e propriedades superiores as existentes.

Os ossos e os dentes de todos os vertebrados são compostos naturais formados por uma matriz orgânica e uma fase dispersa inorgânica, que consiste em nanocristais de HA em forma de hastes embebidas numa matriz de colágeno. Esta estrutura em haste confere a HA melhores propriedades mecânicas (ZHOU; LEE, 2011). Com o objetivo de simular a composição dos ossos e dos dentes, compostos formados por um biopolímero e uma biocerâmica vêm sendo muito estudados nos últimos anos com o objetivo de serem aplicados na substituição óssea.

Alguns estudos recentes relataram a ação da sinvastatina, um agente hipocolesterêmico amplamente utilizado para redução ou controle do colesterol, na estimulação da formação óssea quando aplicada localmente (ANBINDER; QUIRINO; ROCHA, 2006; POLONINI et al., 2011). Esse efeito anabólico que se tem associado à

sinvastatina é um evento almejado na rotina de tratamentos odontológicos, o que pode ser um campo promissor de pesquisas (ANBINDER et al., 2006).

Portanto, neste trabalho serão desenvolvidos biocompósitos de fosfatos de cálcio (npartículas de HA com morfologia controlada) com quitosana (QUIT) /polietilenoglicol (PEG) 6000 como matriz polimérica para liberação controlada de fármacos, no caso, a sinvastatina, objetivando obter um novo material com melhores propriedades morfológicas e químicas semelhantes às do osso humano.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Obtenção de um biocompósito a base de fosfatos de cálcio nanoestruturados e biopolímeros para aplicação em sistemas de liberação controlada de sinvastatina em substituintes ósseos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Síntese e caracterização de hidroxiapatita com diferentes tempos de tratamento hidrotérmico;
- Caracterização da hidroxiapatita através das técnicas de Difração de Raios-X, Espectroscopia na região do Infravermelho, Adsorção/dessorção de N<sub>2</sub>, Potencial Zeta e Microscopia Eletrônica de Transmissão.
- Testes de adsorção de sinvastatina na superfície da hidroxiapatita;
- Fabricação dos biocompósitos de uma combinação de biopolímeros e hidroxiapatita, com a sinvastatina adsorvida na sua superfície, na forma de esponjas.
- Análise microestrutural do biocompósito final por Microscopia Eletrônica de Varredura.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biomateriais

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizada em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (OLIVEIRA, L. S. A. F. et al., 2010). Estes materiais devem apresentar um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam desempenhar a função desejada, além de estimular uma resposta adequada dos tecidos vivos (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

O desenvolvimento da implantologia tem dado incentivo à pesquisa de biomateriais bem como das reações que ocorrem na interface tecido-implante. Inicialmente, utilizavam-se materiais inertes como os aços inoxidáveis e a alumina. Com a introdução do conceito de osteointegração como sendo a ligação direta, estrutural e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante, as pesquisas passaram a se concentrar em materiais e projetos visando diminuir o tempo necessário para a aposição óssea e maior biocompatibilidade, que pode ser definida como a habilidade de um material desempenhar com uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica (SILVA, M. H. P. D., 2000).

Um bom exemplo são as biocerâmicas que apresentam alto grau de bioatividade. Por outro lado, exibem propriedades mecânicas, em geral, não adequadas à necessidade de produção de implantes para fins estruturais. Cerâmicas são caracterizadas por apresentarem baixa tenacidade à fratura e altos módulos de elasticidade quando comparadas com o osso cortical humano que comprometem o uso e processamento desses materiais para aplicações biomédicas. Como solução para a necessidade de produção de materiais bioativos com propriedades mecânicas mais comparáveis à de tecidos como o osso cortical, pode ser citada a produção de compósitos envolvendo a fase bioativa (cerâmica) e um segundo componente (SILVA JUNIOR; ORÉFICE, 2001).

Surge assim, a produção de materiais que apresentem o comportamento bioativo típico da maioria das cerâmicas (capacidade de ligação com tecidos), além de possuir propriedades mecânicas comparáveis a de tecidos como o osso. Como forma de se compatibilizar tais fatores (bioatividade e propriedades mecânicas), estudos levaram à preparação de compósitos de matriz polimérica reforçados por fases cerâmicas bioativas.

Nesse caso, tais fases cerâmicas seriam responsáveis não apenas por reforçar a matriz polimérica, mas também por prover as características bioativas desejadas. Portanto, muitos estudos estão relacionados a uma linha de pesquisa voltada para o desenvolvimento de biomateriais capazes de elucidarem respostas inflamatórias e imunológicas controladas quando em contato com tecidos vivos (SILVA JUNIOR; ORÉFICE, 2001).

### **3.2 Hidroxiapatita**

Entre as biocerâmicas, a HA tem sido intensamente investigada por décadas e ocupa posição de destaque por sua larga aplicação no campo da medicina e da odontologia devido à sua biocompatibilidade e bioatividade. É um fosfato cerâmico – ou biocerâmica – com composição e estrutura similares à fase mineral de ossos e dentes. Dependendo de sua pureza, ela pode suportar aquecimentos superiores a 1.200 °C, sem se decompor. Além disso, pode ser modelada como a maioria dos materiais cerâmicos (COSTA, A. C. F. D. M. et al., 2009; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A HA sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna um bom substituto ósseo e dentário em implantes e próteses, daí o grande interesse em sua produção. Estas propriedades somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da HA um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos (COSTA, A. C. F. D. M. et al., 2009).

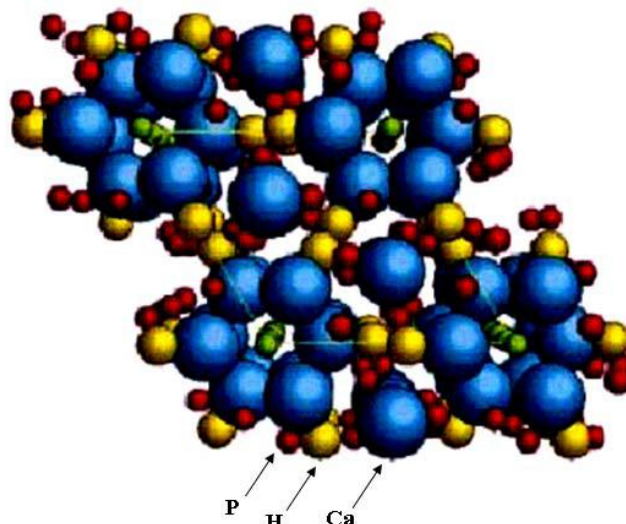
#### ***3.2.1 Estrutura e propriedades***

A HA apresenta fórmula química  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , podendo ser escrita também como  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , mostrando que há duas unidades de fórmula na célula unitária. Cristaliza-se, quando pura, sob a forma monoclinica com espaçamento do grupo espacial  $\text{P}_{21}/b$ . No entanto, em temperaturas acima de 250°C, existe a transição alotrópica da forma monoclinica para hexagonal com grupo espacial  $\text{P}_{63}/m$ , onde P indica que é um sistema hexagonal primitivo. Algumas impurezas, ou substituições parciais da hidroxila por íons cloreto ou fluoreto, estabilizam a forma hexagonal a temperatura ambiente. Por esse motivo, monocristais naturais de HA, geralmente, exibem uma conformação hexagonal. Sua densidade é de 3,16  $\text{Kg/m}^3$  e os parâmetros de rede são  $a = b = 9,43 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,88 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$  e  $\gamma = 120^\circ$  (COSTA, A. C. F. D. M. et al., 2009; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A célula unitária hexagonal da hidroxiapatita contém dez íons cálcio localizados em sítios não equivalentes - quatro no sítio I, tetraédricos ( $\text{Ca}_I$ ) e seis no sítio II, octaédricos ( $\text{Ca}_{II}$ ). Os íons cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção  $c$  da estrutura. Os cátions do sítio I estão coordenados a seis átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de  $\text{PO}_4$  e também a três outros átomos de oxigênio relativamente distantes. A existência de dois sítios de íons cálcio traz consequências importantes para a HA que contém impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza (MAVROPOULOS, 1999).

Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria (eixo  $c$ ). Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons óxidos ( $\text{O}^{2-}$ ) e de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) estão ligadas entre si por íons fosfato. Os átomos de oxigênio dos íons hidroxila estão situados a 0,9 Å abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente  $30^\circ$  com a direção  $c$ . Dos quatro átomos de oxigênio que constituem os grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção  $c$  e os outros dois são paralelos a esta direção (COSTA, A. C. F. D. M. et al., 2009). A Figura 1 mostra o arranjo de uma célula unitária da HA.

Figura 1 - Rede cristalina da hidroxiapatita.



Fonte: (COSTA, A. C. F. D. M. et al., 2009).

Os tetraedros dos grupos  $\text{PO}_4$  estão arranjados de tal forma que possibilitam a formação de dois tipos de canais perpendiculares ao plano basal. O primeiro canal com diâmetro de 2Å é paralelo aos eixos ternários e são ocupados por átomos de  $\text{Ca}(I)$ . Em cada

célula unitária, encontram-se dois canais ocupados por íons Ca(I) que estão localizados em  $z = 0$  e  $z = \frac{1}{2}$  do parâmetro de rede cristalino. O segundo canal que tem diâmetro de 3,0 a 3,5 Å, é constituído por íons Ca(II) e estão localizados em  $z = \frac{1}{4}$  e  $z = \frac{3}{4}$ . No interior desses canais dá-se a distinção entre a forma hexagonal e a monoclinica. Na estrutura hexagonal o grupo hidroxila ocupa apenas 50% das posições estatisticamente possíveis. Deformações na rede causadas pelo deslocamento das hidroxilas tornam a estrutura monoclinica, um arranjo mais fechado, com grupo espacial  $P_{21}/b$ . Exceto a posição do grupo OH, todas as outras posições atômicas no  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , são essencialmente iguais (MAVROPOULOS, 1999).

### 3.2.2 Métodos de obtenção

Um grande número de técnicas foi desenvolvido para a síntese do pó de HA (SANTOS et al., 2005), sendo os principais métodos de obtenção através de reações no estado sólido (PRAMANIK et al., 2007), co-precipitação (KONG; MA; BOEY, 2002), reações hidrotérmicas (TOYAMA; NAKASHIMA; YASUE, 2002; WANG et al., 2010), sol-gel (CHEN et al., 2011), microemulsões (PONOMAREVA et al., 2010) e mecanossíntese (ALMEIDA et al., 2004). Para cada rota são sintetizados produtos com diferentes características e propriedades.

Os pós de HA podem ser sintetizados por três métodos químicos, a saber: um processo a seco; um processo (a precipitação ou hidrólise) por via úmida e um processo hidrotérmico. O método seco tem a grande vantagem de atingir uma composição estequiométrica ( $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$ ) em comparação com o método por via úmida. O método úmido é realizado através de precipitação a partir de misturas de soluções aquosas ou de hidrólise dos fosfatos de cálcio. Pós de HA produzidos pelo processo úmido geralmente possuem uma elevada área superficial e tamanho de partícula fino, no entanto, são não-estequiométricas (Ca deficiente) e de baixa cristalinidade. Por outro lado, pós de HA com várias razões de Ca / P (1,50 – 1,67) podem ser obtidos facilmente a partir da síntese hidrotérmica (LIU, H. S. et al., 1997).

O método de síntese adotado para a obtenção de HA ou o seu tratamento posterior pode levar ao aparecimento ou não de outras fases de compostos de fosfato de cálcio. Estando presentes, podem ser detectadas através de difratometria de raios-X. Normalmente, estas fases apresentam-se em quantidades pequenas (ao redor de 5%) em compostos comerciais. Entretanto, cuidados devem ser tomados para controlar a quantidade destes compostos, uma vez que estes possuem propriedades extremamente diferentes da hidroxiapatita, podendo

comprometer a osteocondução, como no caso do surgimento de pirofosfato de cálcio ou metafosfato de cálcio, ou ainda comprometer a integridade e eficiência mecânica do material em função de sua solubilização (COSTA, A. C. F. D. M. et al., 2009).

Entre os vários processos químicos por via úmida para a produção de nanopós bem dispersos de hidroxiapatita, com diferentes morfologias, a síntese hidrotérmica se revela um dos métodos mais viáveis (L. WANG, 2010). Este é idêntico ao método de precipitação em solução aquosa, mas são usadas nestas sínteses temperaturas e pressões moderadamente elevadas. Em particular, o método hidrotérmico provou ser um método eficaz e conveniente para a preparação de vários materiais inorgânicos com diferentes morfologias e arquiteturas controláveis. As grandes vantagens desse método são a rápida velocidade do processo de formação, juntamente com obtenção de cristais de fosfatos de cálcio com tamanho nanométrico e a possibilidade de obtenção de materiais porosos (SILVA, O. G. D., 2006). Ambientalmente, as vantagens desse método incluem as condições de reação facilmente controláveis em uma escala relativamente grande, alto rendimento em termos de quantidade de produto desejado e a utilização frequente de água como meio de reação (ZHANG et al., 2009).

### ***3.2.3 Aplicações***

Novas aplicações da hidroxiapatita vêm sendo descobertas em todo mundo, na área médica e odontológica (LEGEROS, 1991). Ela tem sido usada extensivamente em implantes e aplicações de regeneração óssea; para a liberação controlada de drogas; uso em creme dental, cimento odontológico, obturação endodôntica (canal da raiz), preenchimento ósseo (grânulos densos ou porosos), como substituto de raízes dos dentes e coroa (VALERETO, 1998); preenchimento de cavidades, na forma de grãos densos ou porosos, bem como no revestimento de implantes metálicos, estes geralmente feitos com o metal titânio. Neste último caso, procura-se melhorar as características dos implantes, combinando-se a resistência mecânica do metal à biocompatibilidade e à atividade biológica do material cerâmico (ROSSI et al.). Por fim, nas aplicações tecnológicas, a HA é usada na adsorção de proteínas em sua superfície, adsorvente em cromatografia líquida, como catalisador na decomposição de compostos orgânicos para tratamento de resíduos e remoção de metais pesados (COSTA, A. C. F. D. M. et al., 2009).



### 3.3 Biopolímeros

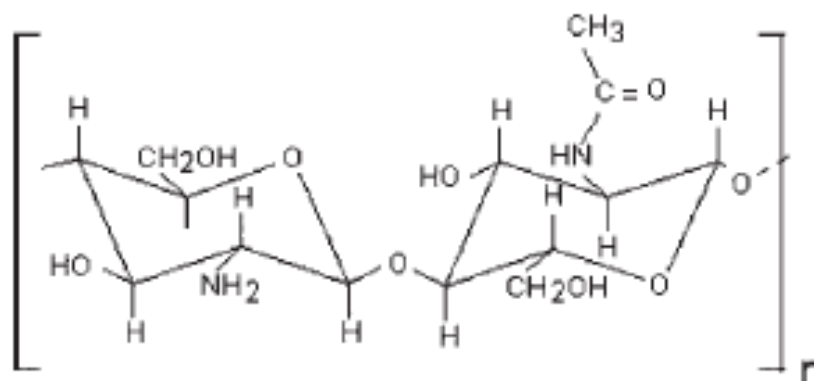
Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros aplicados como biomateriais produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina e outras (BRITO et al., 2011).

Materiais poliméricos sintéticos têm sido amplamente utilizados em fontes médicas descartáveis, materiais prostéticos e dentários, implantes, dispositivos extracorporais, encapsulantes, sistemas de entrega de drogas poliméricas e produtos de engenharia de tecidos (PARK; BRONZINO, 2002), enquanto polímeros porosos têm sido bastante empregados no campo de biomateriais na produção de membranas, suportes para crescimento celular e implantes.

#### 3.3.1 Quitosana

A quitosana (Figura 2) é obtida a partir da desacetilação da quitina por processos de hidrólise básica e composta pelas unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose, as quais são unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . Esse biopolímero apresenta importantes propriedades biológicas tais como baixa toxicidade, não causa alergia, pode ser empregado como anticoagulante, é biodegradável, biocompatível e possui propriedades antibacterianas (JANEGITZ et al., 2007).

Figura 2 - Estrutura da quitosana.



Fonte: (JANEGITZ et al., 2007).

A quitosana pode atuar na prevenção de formação de “biofilmes” de microrganismos (crescimento de fungos e bactérias) em procedimentos ou dispositivos de implantes. Uma investigação preliminar dos efeitos de um revestimento de quitosana sobre o

desenvolvimento de biofilmes bacterianos ou fúngicos, sugere que o revestimento destrói os micróbios essencialmente pela imobilização ou fixação dos mesmos, evitando que os microrganismos se agrupem à superfície do implante. Embora sejam necessárias maiores investigações, caso seja comprovada a possibilidade da quitosana ser uma cobertura efetiva, esta pode se tornar um aditivo poderoso capaz de reduzir de forma significativa as taxas de infecções associadas a implantes e diminuir o risco dos microrganismos desenvolverem resistência aos antibióticos que são utilizados atualmente no revestimento de implantes (V. V. C. AZEVEDO, 2007).

### **3.3.2 Polietilenoglicol (PEG)**

A utilização do polietilenoglicol na engenharia de tecidos está sendo amplamente avaliada devido a sua biocompatibilidade e não imunogenicidade que tem incentivado resposta celular apropriada em aplicações neurais, cardiovasculares e ortopédicas. A combinação de propriedades mecânicas e químicas exibidas pelos hidrogéis de PEG pode ser prontamente alterada para obter uma resposta de células desejadas (SCOTT; ELBERT; WILLITS, 2011).

### **3.4 Biocompósitos**

Os biomateriais modernos não se destinam somente ao preenchimento de espaço, mas também a estimular uma resposta biológica específica em função de suas propriedades. O desempenho específico é de acordo com determinadas condições do ambiente em que se encontram, o que conferem a estes biomateriais o título de materiais inteligentes (MALLMANN, 2010). Os biocompósitos são produzidos no intuito de melhorar as propriedades como processabilidade, resistência térmica, propriedades mecânicas e reológicas, permeabilidade a gases e taxa de degradação (BRITO et al., 2011).

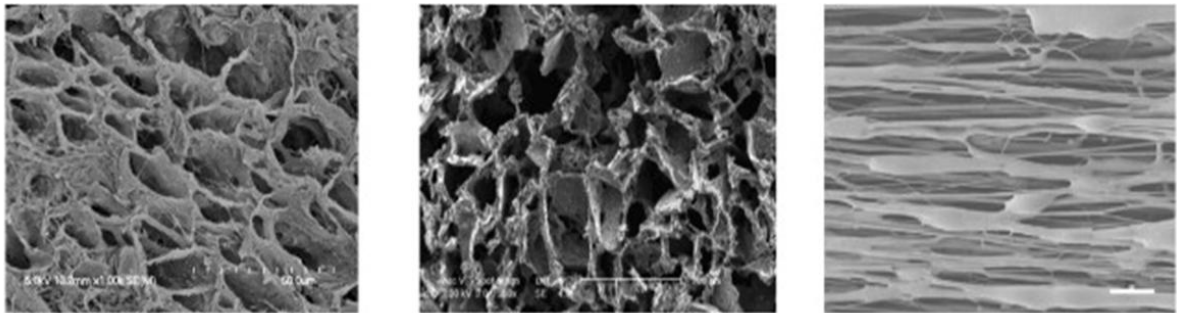
Os biocompósitos são materiais heterogêneos formados por dois ou mais constituintes distintos, combinando diferentes biomateriais para produzir um único dispositivo com desempenho superior à de seus componentes formadores. Para solucionar as desvantagens das cerâmicas e polímeros, novos estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver biomateriais sintéticos híbridos ou compósitos, que possuam as vantagens das

cerâmicas e polímeros. Porém, com melhores taxas de reabsorção após a implantação e melhor resistência mecânica (OLIVEIRA, L. S. A. F. et al., 2010).

### 3.5 “Scaffolds”

A engenharia de tecidos, através de estudos experimentais, tem contribuído para o avanço da medicina regenerativa, por desenvolver suportes sintéticos ou utilizar arcabouços naturais, conhecidos como “scaffolds”, que substituam as funções fisiológicas do tecido ósseo, formando um meio ou microambiente apropriado para as células se organizarem em estruturas funcionalmente similares ao tecido original. Este meio apropriado, de natureza biodegradável, permite a adesão celular ao suporte, a proliferação e segregação do suporte do tecido ósseo, até a obtenção de um substituto artificial funcional com características do tecido original (OLSSON et al., 2008). Na Figura 3 temos micrografias que representam algumas dessas estruturas que servem de suporte para a formação celular.

Figura 3 - Micrografias de biomateriais em “scaffolds” como suporte para a fixação de células e formação de tecidos.



Fonte: adaptado de (MAO, 2008)

Biomateriais em “scaffolds” são aqueles que possuem arcabouço tridimensional poroso, propriedades bioativas e biodegradáveis, que servem de molde para a formação do novo tecido (LIU, X.; MA, 2004). A estrutura deste deve possuir cinco fatores considerados desejáveis: superfície que permita adesão e crescimento celular; nenhum componente ou subproduto de sua degradação deve provocar reações inflamatórias ou tóxicas; apresentar estrutura tridimensional; a porosidade deve proporcionar elevada área superficial para interação célula-“scaffold” e ter espaço para a regeneração da matriz extra-celular (OLSSON et al., 2008).

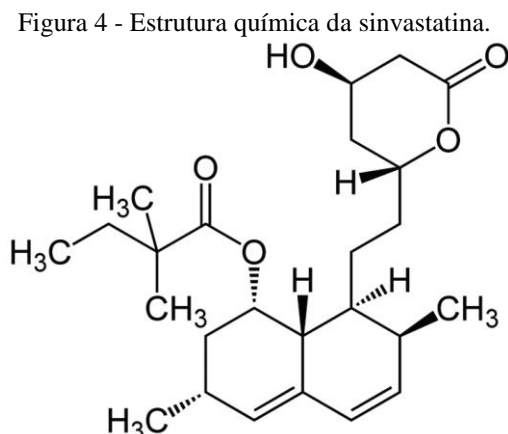
A porosidade dos “scaffolds” influencia o desenvolvimento das células osteoblásticas e, em combinação com as condições de cultura para a funcionalidade dos

tecidos formados *in vitro*, facilitando a chegada de células indiferenciadas desde o periósteo, endósteo e matriz óssea, que se localizam entre as trabéculas do implante e se diferenciam em osteoblastos, formando novo osso (OLSSON et al., 2008).

### 3.6 Sinvastatina

Inibidores da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, ou simplesmente estatinas, são medicamentos muito utilizados nas duas últimas décadas para a redução de níveis elevados de colesterol plasmático. Curiosamente, estudos recentes relataram a ação dessas substâncias na formação óssea, pela estimulação da expressão da proteína morfogenética óssea (BMP)-2 (ANBINDER et al., 2006). Estatinas, tais como a lovastatina, sinvastatina, atorvastatina, cerivastatina e pravastatina apresentam efeitos benéficos, aumentando, de acordo com estudos recentes, a formação óssea em duas a três vezes, por causa dos efeitos potenciais no aumento da diferenciação de células progenitoras ósseas (ANBINDER et al., 2006; FERREIRA et al., 2008).

A sinvastatina é um antilipêmico, de fórmula molecular  $C_{25}H_{38}O_5$ , amplamente consumido no Brasil, e está incluída na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais para o tratamento de cardiopatia isquêmica e de hipercolesterolemia (OLIVEIRA, M. A. D. et al., 2010). É um agente hipocolesterolêmico amplamente utilizado como agente de controle das taxas de colesterol plasmático. Trata-se de uma lactona inativa que é convertida em seu  $\beta,\delta$ -hidroxiácido correspondente (forma ativa), via metabolismo hepático pelo citocromo P450, após administração oral. Este fármaco (Figura 4) é um potente inibidor da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMGCoA) redutase, que catalisa a síntese de colesterol (POLONINI et al., 2011).



Fonte: (POLONINI et al., 2011).

Rojbani (ROJBANI et al., 2011) realizou um estudo comprovando a ação da sinvastatina associada à hidroxiapatita na formação óssea, no qual ratas sofreram um defeito ósseo de 5 mm de diâmetro na dura-máter do cérebro em cada lateral em relação ao plano sagital. Os defeitos foram preenchidos com partículas de substituição. O grupo de cobaias que recebeu preenchimento contendo sinvastatina apresentou maior quantidade de osso novo e taxa de degradação que o grupo que recebeu substituintes sem SINV (ROJBANI et al., 2011).

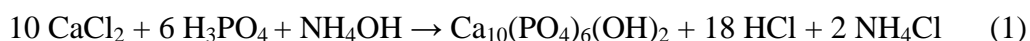
Sendo assim, estuda-se a possível utilização desses medicamentos na Odontologia que poderiam vir a atuar, por exemplo, no reparo de defeitos ósseos causados por lesões intra-ósseas, em fraturas ou como adjuntos na terapia periodontal e auxiliando nos processos de osseointegração (ANBINDER et al., 2006) .

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenvolvimento dos nanobiocompósitos

#### 4.1.1 Síntese da HA via tratamento hidrotérmico

Uma solução aquosa de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,3 mol/L (Quimex, 99,5%) foi adicionada a uma solução aquosa de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,5 mol/L (Dinâmica, 99,67%) sob agitação e com uma relação molar Ca/P=1,67. Formou-se um precipitado branco com a adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30%) sob forte agitação até pH= 9. Manteve-se a suspensão branca sob agitação por mais duas horas. O precipitado foi lavado com água destilada e filtrado a vácuo. O pó foi disperso em uma solução de 0,1 mol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Vetec, 99,5%). A razão de peso entre o precipitado e a solução foi de 1:10. A suspensão foi colocada em um autoclave de Teflon de, aproximadamente, 50 mL com camisa de aço inox e foi submetido ao tratamento hidrotérmico a 150°C por 1,2,4 e 5h. Após essa etapa o material foi filtrado a vácuo, lavado e secado a 80°C (WANG et al., 2010). A reação 1 descreve o processo de síntese;



#### 4.1.2 Extração da sinvastatina de cápsulas farmacêuticas

Macerou-se os comprimidos e foram adicionados 20 mL de acetonitrila (Vetec, 99%). A suspensão formada foi filtrada para separar a sinvastatina (filtrado) do excipiente. A SINV se recristalizou a temperatura ambiente.

#### 4.1.3 Adsorção de sinvastatina na superfície da hidroxiapatita

Em um tubo falcon foram adicionados 100 mg de HA previamente sintetizada e 10 mL de solução de sinvastatina com concentrações de 500,1000 e 2000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  solubilizada em acetonitrila (Vetec, 99%). O tubo foi submetido a forte agitação horizontal por 24 horas e a quantidade adsorvida foi verificada através da medida da absorbância. O gráfico de calibração foi preparado a partir dos dados de concentração (mg/L) versus absorbância (A) (YIN et al., 2003).

O equipamento utilizado foi o GENESYS 10S da THERMO SCIENTIFIC, no laboratório de adsorção e catálise LANGMUIR do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará. Todas as medidas foram realizadas em cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico.

#### ***4.1.4 Modificação da superfície da hidroxiapatita com ácido oleico (AO)***

Submeteu-se 0,3 g de HA a forte agitação magnética em clorofórmio (Synth, 99,8%) por 10 minutos e gotejou-se 10 mL de ácido oleico. A mistura foi agitada por 30 min (adaptado de LUO et al., 2010).

#### ***4.1.7 Preparo dos “scaffolds” de Quitosana e PEG com HA***

A quitosana (Sigma Aldrich, 96% de desacetilação) foi dissolvida em uma solução de ácido acético 1%, sob forte agitação por aproximadamente 3h em uma proporção de 2% (m/v). Em seguida, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos para separação de possíveis impurezas.

O PEG (Sigma Aldrich, 6000) dissolvido em água destilada em com uma proporção de 2% (m/v), sob agitação magnética por dez minutos.

Os “scaffolds” foram preparados em uma razão 70/30 (m/m) Quitosana/PEG (2:1) e HA. A mistura foi submetida a agitação por 10 minutos e sonicada por 30 min. Aproximadamente 8 g da mistura foi colocada em moldes de 5 cm de diâmetro. A solução quitosana/PEG com HA foi congelada por 24 h a 18°C. Em seguida, liofilizou-se por 48h.

#### ***4.1.8. Ensaios teóricos***

Os dados obtidos por difração de raios-x foram lidos pelo software “Materials Studio 5.0”, dando origem à célula unitária de cada sistema de HA. A estes foram adicionados hidrogênios e, em seguida, obteve-se a estrutura relaxada utilizando o software de cálculos abinitio DMOL<sup>3</sup>, pelo método de Density Functional Theory (DFT). Tendo a célula unitária com sua estrutura estável, replicou-se dez vezes nos eixos X e Y, obtendo uma superfície plana.

Os cálculos de adsorção foram realizados utilizando o software Adsorption Locator que é uma ferramenta que usa o método de Monte Carlo para determinar a posição e a

orientação da molécula acima de um substrato de correção, bem como para determinar a energia de interação. O campo de força usado foi o Universal, pois tem parâmetros para um número variado de átomos, incluindo o cobre. Foram usados 25 ciclos de aquecimento com 10 mil passos de interação cada um. A temperatura variou entre 298 e 300 K. A qualidade ultrafina foi utilizada nos cálculos, implicando que os parâmetros utilizados foram:  $2 \times 10^{-5}$  kcal.mol<sup>-1</sup> de variação de energia,  $10^{-3}$  kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-1</sup>, variação da força máxima e  $1 \times 10^{-5}$  Å de deslocamento máximo nas coordenadas cartesianas.

## **4.2 Caracterização**

### ***4.2.1 Difração de raios-x***

As medidas de Difração de raios-x (DRX) foram realizadas em um aparelho “X-ray powder diffractometer” Xpert MPD (Panalytical), equipado com tubo de CoK $\alpha$  ( $\lambda = 1,7890$  nm), voltagem de 40 kV com uma corrente de 30 mA em um intervalo de varredura  $2\theta = 20 - 90^\circ$ , tendo sido realizadas as medidas no laboratório de raios-X no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará. Para interpretação e análise dos difratogramas foi utilizado o método Rietveld de refinamento de estrutura com uso do programa que aplica o método Rietveld, DBWS (BLEICHER; SASAKI; SANTOS, 2000).

### ***4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho***

Para a obtenção dos espectros de infravermelho, as amostras foram maceradas em almofariz de ágata e prensadas em forma de pastilhas com KBr, em uma proporção 1:10 entre amostra:KBr. Após o processo de prensagem, foram registrados os espectros de intervalo de 4.000 a 400 cm<sup>-1</sup>, em um aparelho Shimadzu FTIR 8300, na Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica.

### ***4.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão***

A análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão foi realizada em um equipamento Jeol JEM – 1011 operando em 100 kV e equipado com uma câmera CCD Orius 831 da Gatan. As amostras foram diluídas, depositadas em grades de carbono e revestidas com cobre. Posteriormente as amostras depositadas foram secas completamente a 60°C por



uma noite, antes da análise. Estas análises foram realizadas em parceria com a Università del Salento - Itália.

#### ***4.2.4 Adsorção/dessorção de nitrogênio***

Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio foram obtidas a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  sobre uma ampla faixa de pressão relativa, de 0,001 a 0,1 em equipamento modelo Autosorb 1 Quantachrome Instrument. Todas as amostras foram degasadas a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 horas utilizando gás nitrogênio a 77 K antes das medidas. As áreas superficiais foram determinadas através da teoria das isotermas de adsorção de nitrogênio de Brunauer, Emmett e Teller (BET) (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). As curvas de distribuição de tamanho de poro foram calculadas usando o ramo de adsorção da isoterma e o método de Barret-Joyner-Halenda (BJH), o tamanho dos poros foi obtido a partir da posição dos picos na curva de distribuição. Essas medidas foram realizadas no departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

#### ***4.2.5 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta***

Na caracterização da SINV, os espectros na região do ultravioleta foram traçados na faixa de comprimento de onda 190 a 300 nm, utilizando-se solução de  $16\text{ }\mu\text{g/mL}$  de SINV em acetonitrila. Os máximos de absorção foram comparados com os descritos na literatura. O equipamento utilizado foi o GENESYS 10S da THERMO SCIENTIFIC, no laboratório de adsorção e catálise LANGMUIR do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará. Todas as leituras foram realizadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

#### ***4.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial***

As curvas DSC foram obtidas no equipamento DSC Q20 V24.9 Build 121 sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de  $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , com aquecimento até  $450^{\circ}\text{C}$ . As medidas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Análises Térmicas, no Departamento de Química Inorgânica e Orgânica na Universidade Federal do Ceará.

#### ***4.2.7 Análise Térmica***

As amostras foram submetidas à análise termogravimétrica (TG) em equipamento modelo TGA Q50 V20.13 Build 39 da TA Instruments. A faixa de temperatura usada foi de 0 a 900°C, com razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> em atmosfera de N<sub>2</sub>. Com vazão de 25 mL.min<sup>-1</sup>. Análises simultâneas TG-DTG (termogravimetria diferencial) das amostras foram realizadas em temperaturas entre 0 e 900°C, com razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>. As medidas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Análises Térmicas, no Departamento de Química Inorgânica e Orgânica na Universidade Federal do Ceará.

#### ***4.2.9 Potencial Zeta***

Para medir o Potencial Zeta, as amostras foram sonicadas por cinco minutos em ultrassom de banho de baixa potência e, posteriormente, diluídas em água deionizada. Em seguida, a amostra diluída foi colocada em uma cubeta específica para a medida e levada ao equipamento Analisador de nanopartículas com Potencial Zeta da marca MALVERN, modelo ZEN3600, tendo como meio dispersante água, temperatura ajustada para 25°C e pH = 6. As medidas foram realizadas em colaboração com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), na Universidade Federal do Ceará.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

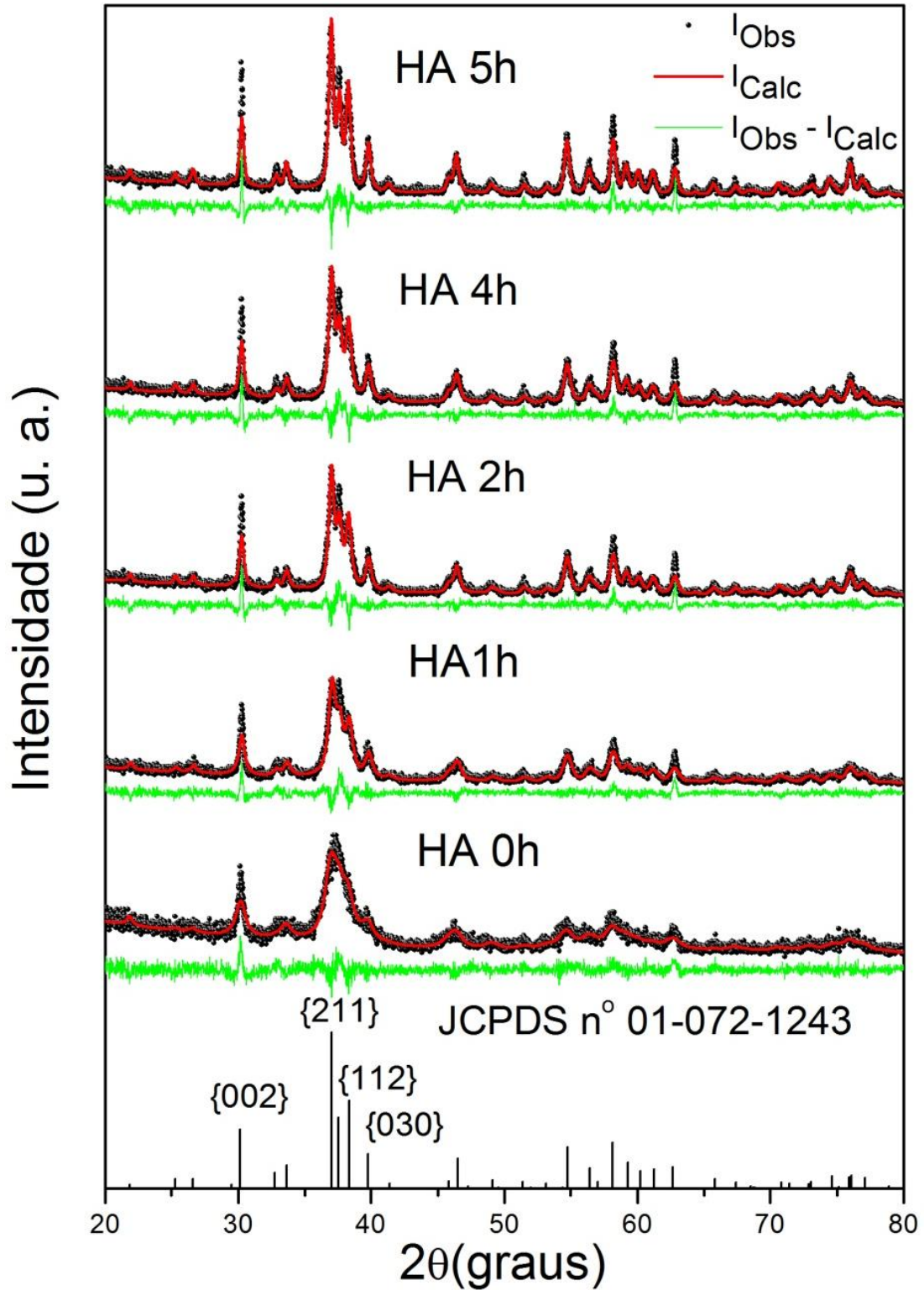
### 5.1 Caracterização das nanopartículas de HA

#### 5.1.1 Difração de raios-x

As fases cristalinas foram examinadas por comparação aos difratogramas com o banco de dados ICDD relativo ao padrão da HA (ICDD/PDF-01-6742). A Figura 5 mostra o refinamento pelo método de Ritveld das amostras de HA. Estas são identificadas de acordo com seus diferentes tempos de tratamento – especificamente, HA 0h, HA1h, HA2h, HA4h e HA5h. Os picos observados (pontos pretos) são quase coincidentes com os valores calculados (linha vermelha), sendo que a linha verde representa a diferença entre a intensidade observada ou experimental ( $I_{Obs}$ ) e a intensidade calculada ( $I_{Calc}$ ), o último obtido pelo refinamento.

Adicionalmente, deve-se ressaltar que no método de Rietveld, uns dos valores mais importantes a serem avaliados são o  $R_{wp}$  (porcentagem de erro obtido) e o  $S$  (razão do erro previsto pelo erro esperado), uma vez que estes se referem à concordância e ao progresso do refinamento (KNOWLES et al., 1996). A literatura reporta que valores considerados bons de  $R_{wp}$  são de 2-10%, enquanto que os valores típicos obtidos variam de 10-20% (FANCIO, 1999). Valores de  $S \leq 1,3$  indicam um refinamento satisfatório (CASAGRANDE; BLANCO, 2005). Portanto, foram obtidos valores aceitáveis para as amostras sintetizadas neste trabalho (Tabela 1).

Figura 5 - Padrões de DRX obtidos para amostras de hidroxiapatita sintetizadas por diferentes tempos de tratamento hidrotérmico.



Fonte: próprio autor.

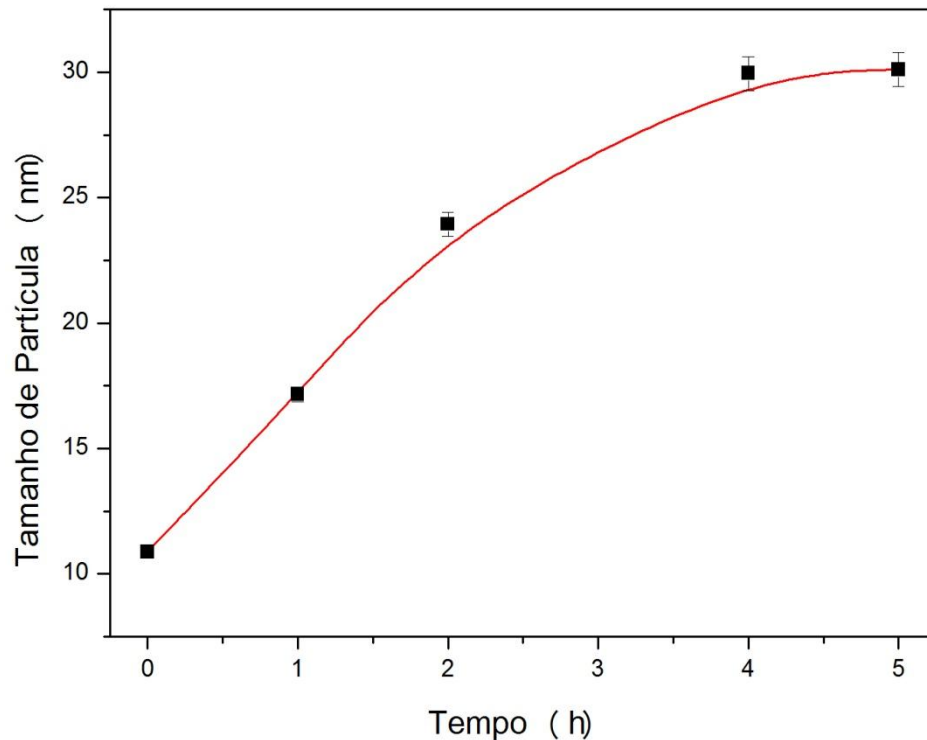
Tabela 1- Resultados dos parâmetros estruturais refinados pelo método de Rietveld para as amostras de HA.

Amostra	Dens. calculada (g. cm <sup>-3</sup> )	Parâmetro de rede cristalino (Å)	Tamanho médio de partícula (nm)	R <sub>wp</sub> (%)	S
HA 0h	3,118	a = b = 9,4688; c = 6,8787	10,7 ± 0,1	17,78	0,98
HA 1h	3,125	a = b = 9,4599; c = 6,8772	17,1 ± 0,3	17,72	1,05
HA 2h	3,127	a = b = 9,4586; c = 6,8711	23,9 ± 0,5	18,45	1,12
HA 4h	3,123	a = b = 9,4687; c = 6,8693	29,9 ± 0,7	21,21	1,09
HA 5h	3,124	a = b = 9,4666; c = 6,8698	30,1 ± 0,7	20,57	1,10

Fonte: próprio autor.

A variação dos valores de tamanho de partícula e densidade para as amostras de HA foram 10-30 nm e ~3.12 g.cm<sup>-3</sup>, respectivamente, como observado na Tabela 1. Todas as amostras apresentaram uma única fase, Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, com sistema cristalino hexagonal e uma proporcionalidade direta entre a extensão do tratamento hidrotérmico e crescimento dos cristais em termos de tamanho de partícula (Figura 6). Esse comportamento já era esperado visto que uma maior temperatura de calcinação fornece maior força motriz para o crescimento dos grãos (COSTA, A. C. F. M. et al., 2007). Portanto, o método apresentado permite o controle do tamanho das partículas do nanomaterial. Também foi observado que a intensidade relativa do pico de difração se torna maior com o aumento do tempo de aquecimento, tal como evidenciado na Figura 5. Isso indica que a organização cristalina das nanopartículas de HA aumenta ao longo do tempo de aquecimento. O tamanho de partícula do cristal e o grau de organização da hidroxiapatita podem ser avaliados qualitativamente pelos picos de difração de raios-X, pois, quanto mais cristais em um plano de uma estrutura, mais intensos, pontiagudos e estreitos serão os picos no difratograma. A parcela amorfa gera picos mais largos e menores (ARAÚJO, 2006; CANEVAROLO, 2003).

Figura 6 - Relação entre tempo de tratamento hidrotérmico e tamanho de partícula.



Fonte: próprio autor.

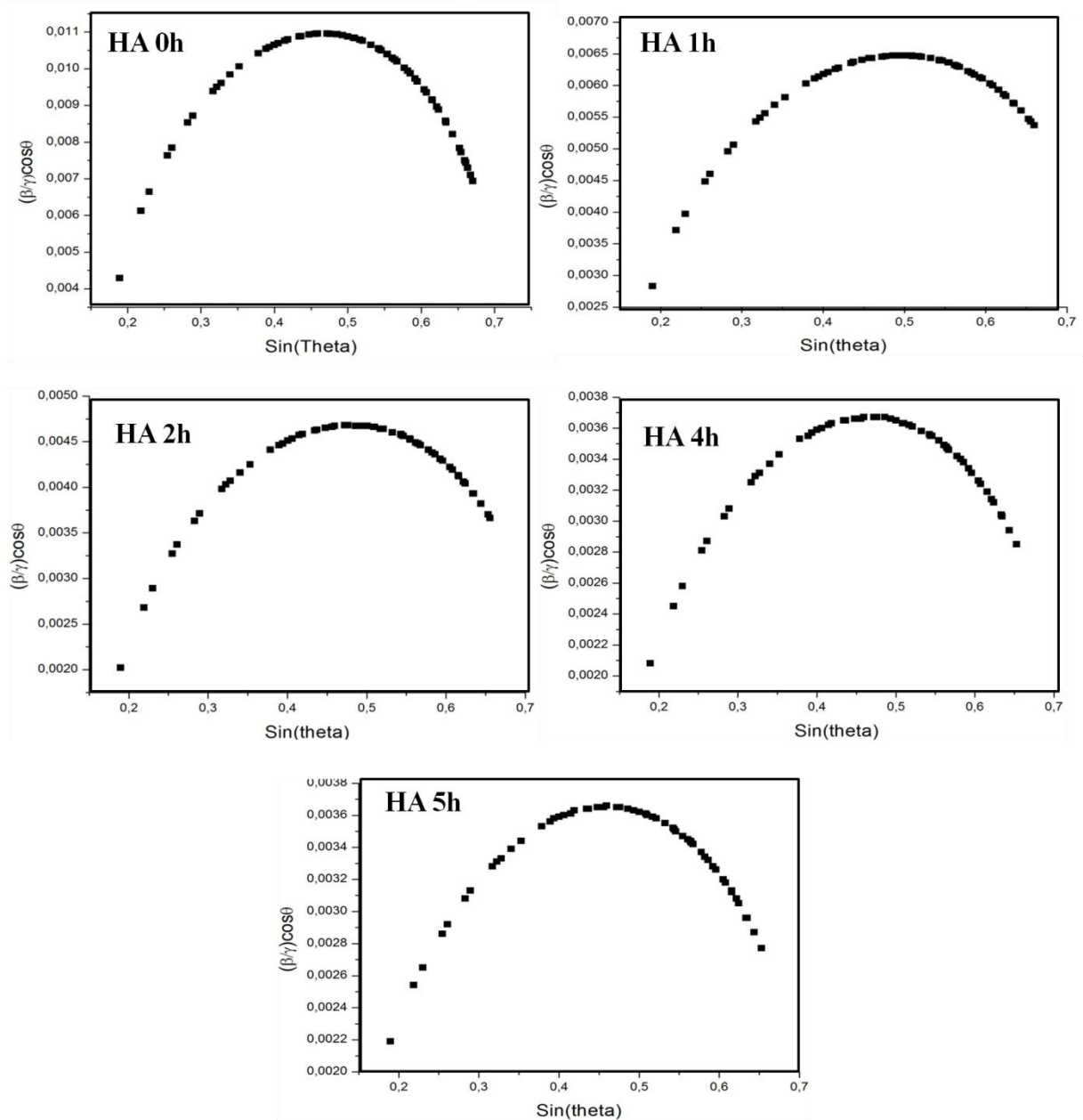
Os padrões de difração expostos na Figura 5 evidenciam que um tratamento térmico a 150°C melhora e/ou favorece a formação de partículas maiores dos cristais das amostras de HA, já que para a amostra HA 0h, onde não houve tratamento hidrotérmico, produziu-se picos largos e com baixa intensidade relativa. Contudo, partículas de dimensões inferiores a 1µm podem apresentar valores de  $2\theta$  pouco superiores e inferiores ao valor do ângulo de Bragg devido ao efeito de alargamento de picos face ao tamanho de partículas. Tal fato se deve ao menor número de planos que difratam os raios X, em função das pequenas dimensões dos cristalitos, permitindo a difração para valores de comprimento de onda superiores ou inferiores ao valor de  $\lambda$ . Isto justifica as intensidades relativas dos picos associados com o tamanho de partícula da amostra HA 0h menores em comparação com as outras amostras.

Além disso, a mudança na razão das intensidades relativas dos picos {211}, {112} e {030} com relação aos difratogramas reportados da literatura (POSNER; PERLOFF; DIORIO, 1958), indica que um progressivo prolongamento do tratamento hidrotérmico resultou em um crescimento do cristal em direção ao eixo c (MA; XIA; LIAO, 2011). Pode-se dizer, então, que há uma orientação preferencial. Este fato ocorre quando os cristalitos presentes em um material tendem a ser mais orientados em uma direção (ou um conjunto de direções) que em outras. Em geral, o eixo c de cristais hexagonais, como no caso da

hidroxiapatita, tem um arranjo fechado empacotado e, portanto, a terminação da superfície no eixo c do prisma é preferida no intuito de minimizar a energia livre de superfície. Os efeitos da orientação preferencial foram observados antes na variação das intensidades relativas dos picos de difração (KNOWLES et al., 1996; ZHU et al., 2008).

A homogeneidade da partícula pode ainda ser analisada através do gráfico de Williamson-Hall, exibido na Figura 7. Observou-se que as amostras de HA hidrotermicamente tratadas não são homogêneas, fato este, evidenciado pelo perfil não linear dos gráficos. Sendo assim, os valores calculados para o tamanho de partícula (D) e a microdeformação ( $\epsilon$ ) são apenas uma aproximação. Isso porque esses valores são extraídos a partir das larguras dos picos nos padrões de difração através da linearidade do gráfico de Williamson-Hall, ou seja, pelos coeficientes linear e angular quando o gráfico é uma reta. Portanto, não faz sentido calcular esses valores para essas amostras.

Figura 7 - Gráficos de Williamson-Hall para as amostras de HA sintetizadas.



Fonte: próprio autor.

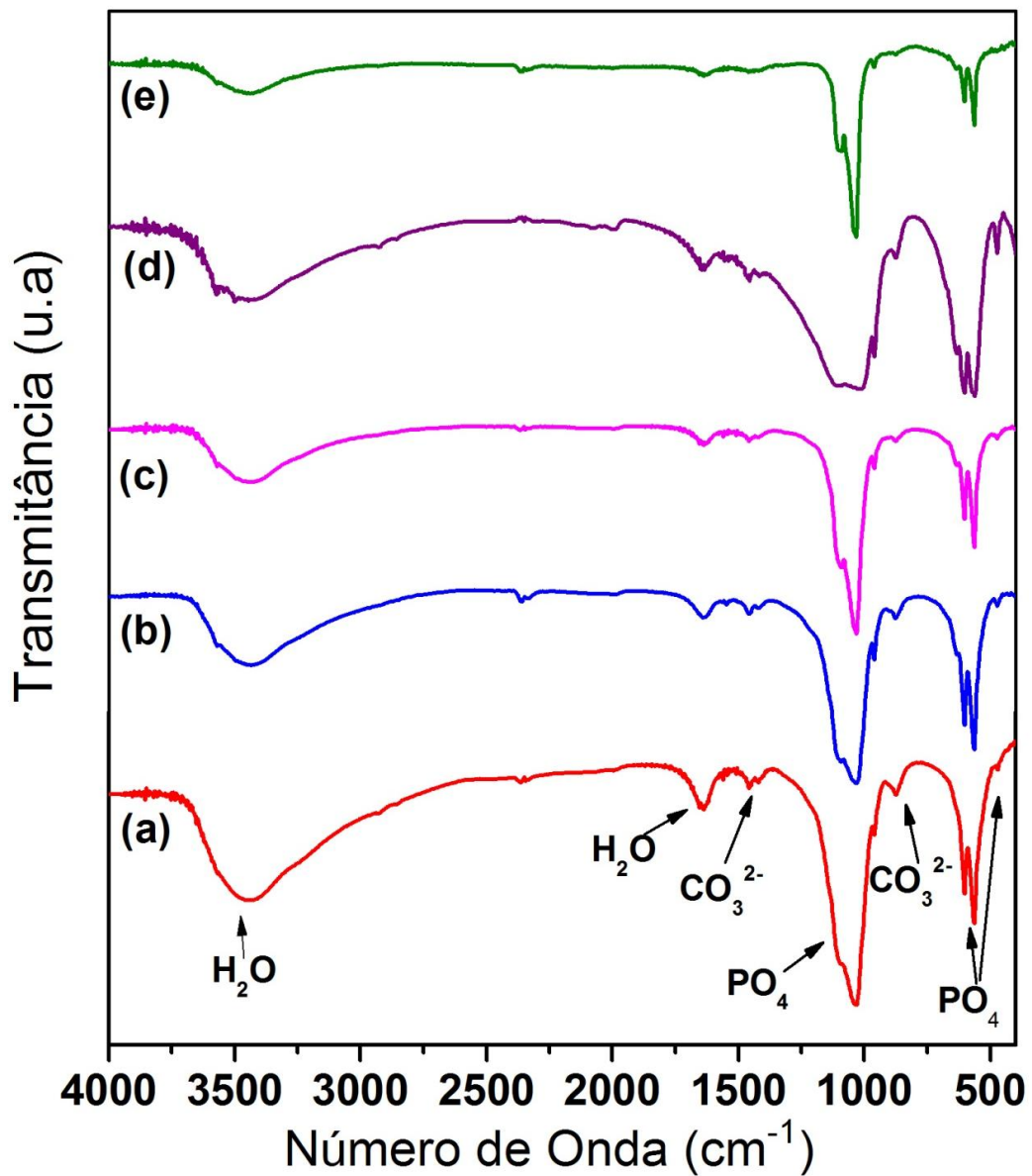
### 5.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A Figura 8 mostra os espectros de FTIR dos nanocristais sintetizados com bandas de absorção características de amostras de HA. É utilizado o número de onda ( $\nu_i$ ) ( $\text{cm}^{-1}$ ), cujo índice  $i$  representa o nível vibracional da molécula. A posição das bandas nos espectros depende das massas relativas dos átomos, geometria e constantes de forças de ligação que provocam alterações no momento dipolo (SILVA, C. C. D., 2003).



Nestes espectros, observou-se uma banda em torno de  $3500\text{ cm}^{-1}$  que foi atribuída às vibrações de estiramento dos grupos OH, tanto da água adsorvida quanto dos grupos OH dos fosfatos e sua deformação apareceu em torno de  $640\text{ cm}^{-1}$ . Uma banda larga foi observada na região entre  $3700$  e  $2500\text{ cm}^{-1}$  atribuída à água fisicamente adsorvida e outra em torno de  $1620\text{ cm}^{-1}$  para a deformação angular do grupo hidróxido da  $\text{H}_2\text{O}$  fisissorvida (ARENDS et al., 1987; RAMAKRISSHNAN; ARULDHAS, 1986).

Figura 8 - Espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras HA0h (a), HA 1h (b), HA 2h (c), HA 4h (d) e HA 5h (e).



Fonte: próprio autor

Todos os estiramentos e modos vibracionais dos grupos funcionais das amostras de HA foram identificados por espectroscopia FTIR e expostos na Tabela 2. As bandas muito fortes ( $\nu_s$ ) observadas, respectivamente, em 1931 e 1033  $\text{cm}^{-1}$  foram associados com estiramentos vibracionais fora do plano ( $\nu_3$ )<sub>so</sub> de P-O, ao passo que a banda fraca ( $w$ ) centralizado em 960  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuído à vibração de estiramento simétrico ( $\nu_1$ )<sub>ss</sub> de O-P-O.

Os modos vibracionais ( $\nu_4$ )<sub>b</sub> fortes ( $s$ ) do O-P-O podem ser observados nos números de onda entre 563 e 603  $\text{cm}^{-1}$ . O estiramento simétrico do modo fraco ( $\nu_2$ )<sub>ss</sub> de P-O é observado nos números de onda 470 e 474  $\text{cm}^{-1}$ . As vibrações associadas com ( $\nu_3$ )<sub>so</sub>  $\text{CO}_3^{2-}$  estão entre 1417 e 1460  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que as vibrações referentes a ( $\nu_2$ )<sub>ss</sub> de  $\text{CO}_3^{2-}$  aparecem entre 873 e 875  $\text{cm}^{-1}$ . A presença de  $\text{CO}_3^{2-}$  é atribuída à incorporação de espécies provenientes do ar, visto que as amostras foram produzidas em atmosfera aberta e em solução aquosa (ARENDS et al., 1987; RAMAKRISHNAN; ARULDHAS, 1986).

Os espectros de FTIR das amostras HA 1, 2, 4 e 5h, respectivamente, tratadas em solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1M, confirmam que os íons  $\text{NH}_4^+$  (os quais poderiam causar problemas em aplicações biológicas) introduzidos para direcionar a morfologia das amostras não permanecem na estrutura dos produtos finais, pois foram removidos com o processo de lavagem do material. A Tabela 3 traz um resumo das absorções observadas nos espectros para a HA.

Tabela 2 - Modos vibracionais nos espectros do infravermelho obtidos para as amostras de HA.  
Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ )

	HA REF	HA0h	HA1h	HA2h	HA4h	HA5h
H <sub>2</sub> O		1639w	1537w	1637w	1633w	1637w
		3348s	3434s	3448s	3346w	3444w
$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$	1469					
$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$	1454	1452w	1460w	1458w	1456w	1460w
$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$	1415	1419w	1421w	1421w	1417w	
$\nu_3(\text{P-O})_{(\text{so})}$	1088vs	979-1176 vs	979-1164 vs	1093vs	975-1174 vs	1097vs
$\nu_3(\text{P-O})_{(\text{so})}$	1065vs					
$\nu_3(\text{P-O})_{(\text{so})}$	1035vs			1931vs		1033vs
$\nu_1(\text{O-P-O})_{(\text{ss})}$	962s	960w	960w	960w	960w	960w
$\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$	874w	873w	875w	873w	875w	-
OH livre	631s	-	634w	634w	634w	634w
			3571w	3569w	3573w	3569
$\nu_4(\text{O-P-O})_{(\text{b})}$	602s	603s	601s	603s	601s	603s
$\nu_4(\text{O-P-O})_{(\text{b})}$	574s	-	-	-	-	-
$\nu_4(\text{O-P-O})_{(\text{b})}$	565s	563s	563s	564s	563s	563s
$\nu_2(\text{P-O})_{(\text{ss})}$	474w	470w	472w	472w	472w	-
$\nu_2(\text{P-O})_{(\text{ss})}$	462w					

b = bending ss = “stretching” simétrico so = “stretching” fora do plano

Intensidades das bandas:

w = fraca s = forte vs = muito forte

Tabela 3 - Bandas de absorção na região do infravermelho da hidroxiapatita .

Região de Absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )	Região de Absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )
3700 – 2500	$\nu$ O-H de $\text{H}_2\text{O}$ adsorvida e O-H de grupos OH
1620	$\delta$ O-H de $\text{H}_2\text{O}$ adsorvida
1087	$\nu$ P-O do grupo $\text{PO}_4^{3-}$
1030	$\nu$ P-O do grupo $\text{PO}_4^{3-}$
956	$\nu$ P-O do grupo $\text{PO}_4^{3-}$
865	$\nu$ P-O(H) do grupo $\text{PO}_4^{3-}$
640	$\delta$ O-H de grupo OH
610	$\delta$ P-O do grupo $\text{PO}_4^{3-}$
560, 450	$\delta$ P-O(H) do grupo $\text{HPO}_4^{2-}$

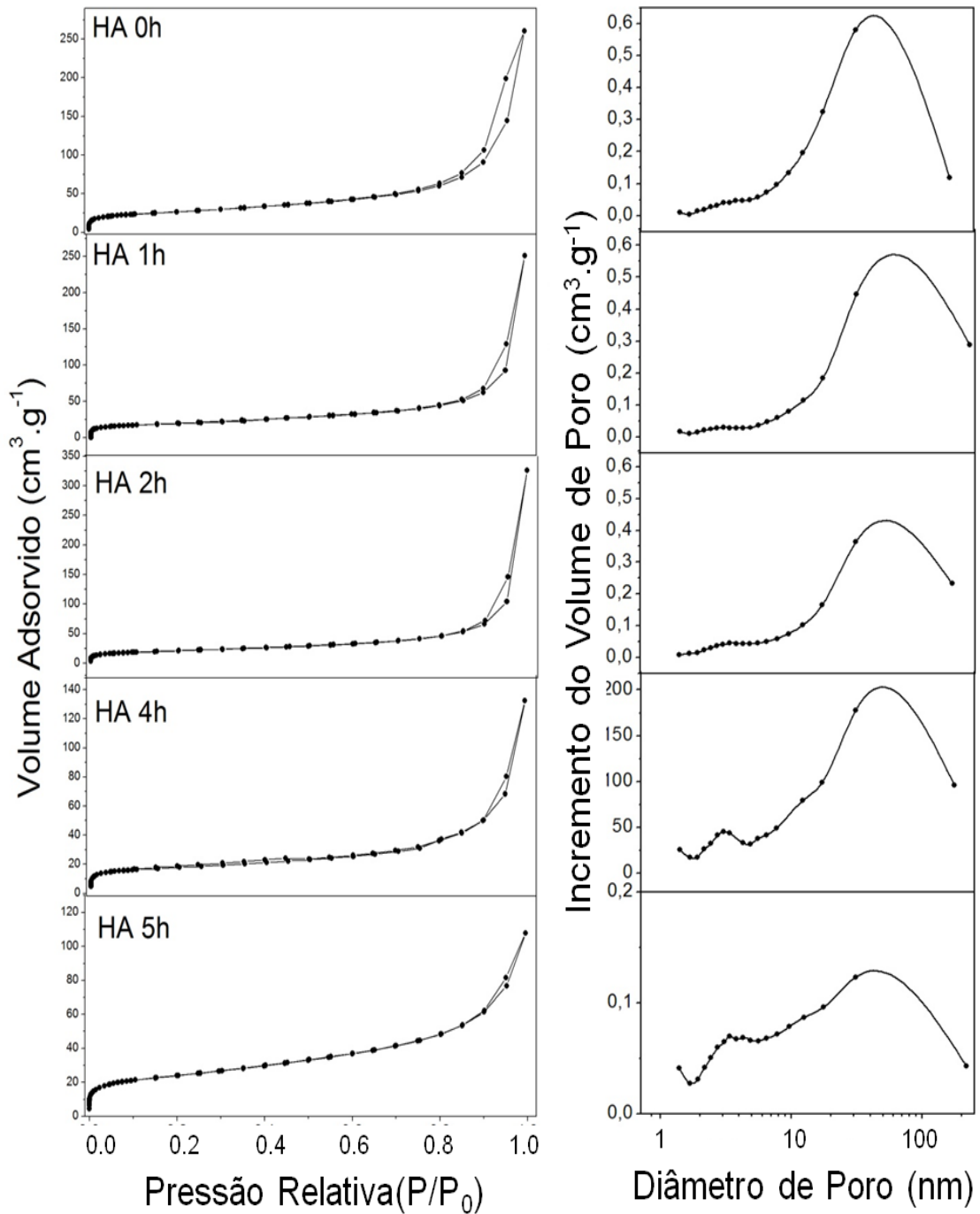
Fonte: (ARENDS et al., 1987; RAMAKRISSHNAN; ARULDHAS, 1986).

### 5.1.3 Estimativa da área de superfície específica por estudos de adsorção/dessorção de $\text{N}_2$

As respectivas isotermas de adsorção/dessorção de  $\text{N}_2$  e as curvas de distribuição de tamanhos de poros dos nanocristais de HA estão expostas na Figura 9. Se por um lado, a amostra HA 0h apresenta a tendência de uma típica isoterma do tipo IV, segundo a classificação da IUPAC (FIGUEIREDO; RIBEIRO, 1989), exibindo um perfil que é característico de materiais mesoporosos em uma variação de tamanho de poro entre 2 e 50 nm (FIGUEIREDO; RIBEIRO, 1989), todas as demais amostras mostraram características de uma isoterma do tipo II, típicas de superfícies não porosas (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001). A isoterma da amostra HA 0h apresentou curvas com histereses do tipo H3. Nos outros casos, quase não há nenhuma evidência de histerese. Entretanto, a não existência de um ciclo de histerese não implica a ausência de porosidade, uma vez que o formato dos poros pode conduzir a iguais processos de adsorção e dessorção (TEIXEIRA et al., 2001). Neste respeito, a HA pode ser considerada um material que geralmente apresenta mesoporosidade (ZHAO et al., 2011). Nas medidas de distribuições de poros, observou-se para as cinco amostras sintetizadas uma concentração de poros na região de mesoporos. Todas as curvas apresentam um leve afastamento, o que sugere fenômeno de condensação capilar e, conseqüentemente, indica a presença de mesoporos. Entretanto, estas isotermas apresentam poros com menores histereses. Portanto, as isotermas aparentemente indicaram uma baixa porosidade, que pode ser justificada pela presença de poros não cilíndricos (TEIXEIRA et al.,

2001). As isotermas das amostras HA 4h e HA 5h, exibem menores histereses, quando comparadas com as demais amostras que foram submetidas a um menor tempo de aquecimento, indicando que a temperatura teve um efeito muito significativo na porosidade das amostras (ROSA; SHAREEF; VAN NOORT, 2000).

Figura 9 - Isotermas de adsorção de nitrogênio e curvas de distribuição de tamanhos de poros das amostras de HA.



Fonte: próprio autor.

Os valores de área de superfície específica ( $S_{BET}$ ), volume total de poro ( $V_P$ ) e diâmetro médio de poro ( $D_p$ ) dos correspondentes materiais foram obtidos pelos métodos de BET e BJH (Tabela 4). As amostras de HA que foram submetidas ao tratamento hidrotérmico apresentaram relativa baixa área superficial. Então, a relação da área superficial medida por BET e o tamanho de partícula calculada por DRX (Tabela 1), indicam que o aumento do tamanho de partícula favorece a redução da área superficial.

Tabela 4 - Resumo das análises de adsorção/dessorção de nitrogênio.

AMOSTRA	$S_{BET}^1$ ( $m^2.g^{-1}$ )	$V_P^2$ ( $cm^3.g^{-1}$ )	$D_p^3$ (nm)
HA 0h	80,0	0,4044	20,22
HA 1h	63,89	0,5058	31,67
HA 2 h	59,38	0,3891	26,21
HA 4h	43,57	0,2054	18,86
HA 5h	52,59	0,1673	12,72

<sup>1</sup>Área superficial, <sup>2</sup>Volume de poro, <sup>3</sup>Diâmetro médio de poro.

Fonte: próprio autor.

#### 5.1.4 Potencial Zeta

Estudos mostram que a carga superficial dos fosfatos de cálcio tem um forte efeito na adesão celular (SUZUKI, TAKAHIRO et al., 1996; SUZUKI, T. et al., 1997).

Os valores negativos de PZ obtidos (Tabela 5) para as amostras sintetizadas estão em conformidade com os resultados reportados da literatura para cerâmicos de fosfato de cálcio (FERRAZ et al., 2001). Esses indicam que o tratamento hidrotérmico não promove uma mudança significativa na carga superficial da HA.

Tabela 5 - Potencial Zeta das amostras sintetizadas.

AMOSTRA	POTENCIAL ZETA (mV)
HA 0h	-12,83 ± 0,3
HA 1h	-9,57 ± 0,6
HA 2h	-14,33 ± 1,1
HA 4h	-12,93 ± 0,1
HA 5h	-14,53 ± 0,4

Fonte: Próprio autor.

Se todas as partículas em suspensão possuem um grande valor de PZ, positivo ou negativo, estas vão ter a tendência de repelirem umas as outras e não terão a tendência de flocular. Mas, se as partículas possuem valores de um potencial zeta baixos, não existe nenhuma força para prevenir as partículas de se aglomerarem e flocularem. A linha geral que divide uma suspensão estável e instável é geralmente tida como o limite entre +30 mV ou -30 mV. Ou seja, partículas com PZ mais positivo que + 30 mV ou mais negativo que -30 mV são normalmente consideradas estáveis.

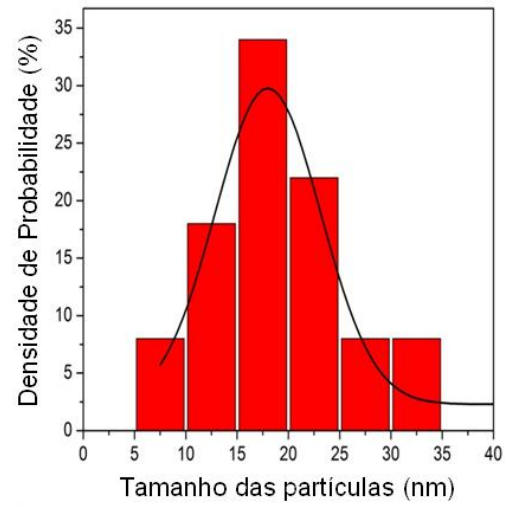
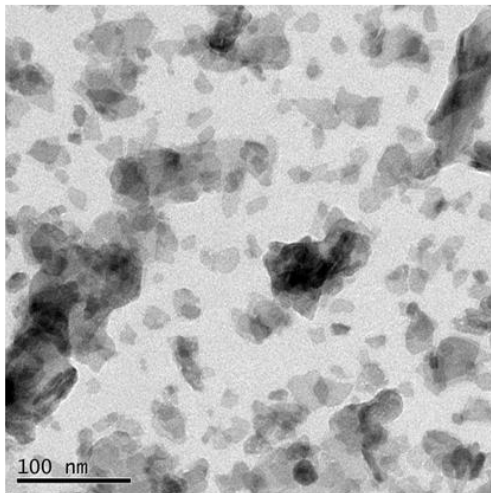
Assim, pode-se afirmar que as nanopartículas obtidas são instáveis. Contudo, a instabilidade da superfície da biocerâmica em um fluido biológico é um efeito desejado, a fim de alterar a estrutura química para um estado adequado da ligação de tecidos in vivo, bem como in vitro. A instabilidade é um fator de aceleração da osteocondutividade e favorece a afinidade química e conectividade com o tecido ósseo no corpo (SUZUKI, T. et al., 1997).

### ***5.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão***

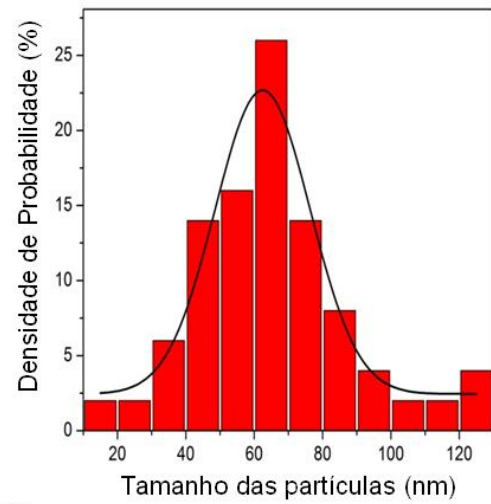
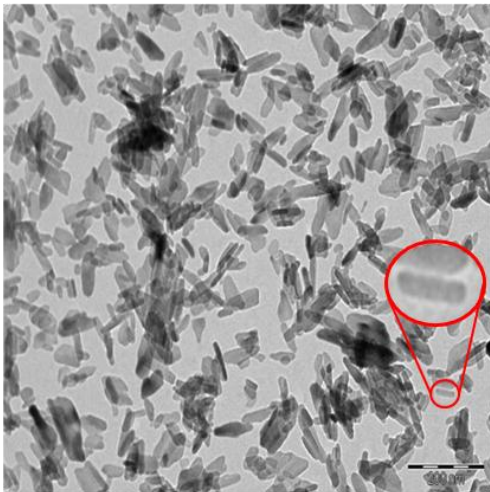
A Figura 10 exhibe as imagens de MET para as amostras: (A) HA0h, (B) HA2h, (C) e HA5h, hidrotêrmicamente tratadas em solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a  $150^\circ\text{C}$ . É evidente a tendência de crescimento para desenvolver a morfologia em forma de haste, que se estende sobre o tempo de aquecimento. Comparativamente a HA0h, sem tratamento hidrotérmico, foi observado que as amostras sintetizadas com solução  $\text{NH}_4\text{Cl}$  apresentaram nanocristais maiores e mais uniformes. Wang e colaboradores (WANG et al., 2010) também obtiveram nanopartículas de HA em forma de haste e sugeriram que os íons cloreto desempenham um importante papel no controle da morfologia das nanopartículas. Portanto, existe uma clara orientação preferencial em direção ao eixo (KNOWLES et al., 1996) na cristalização das amostras que foram submetidas ao tratamento hidrotérmico.

As distribuições do tamanho de partícula, obtidas através da inspeção das micrografias, indicam os valores estatísticos para o tamanho de partícula do material. O valor médio do tamanho dos cristais ou grãos para as amostras HA0h, HA2h e HA5h foram 18,0, 62,8 e 84,6 nm, respectivamente.

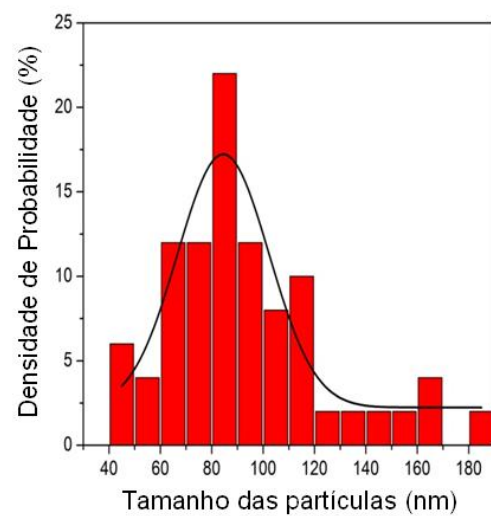
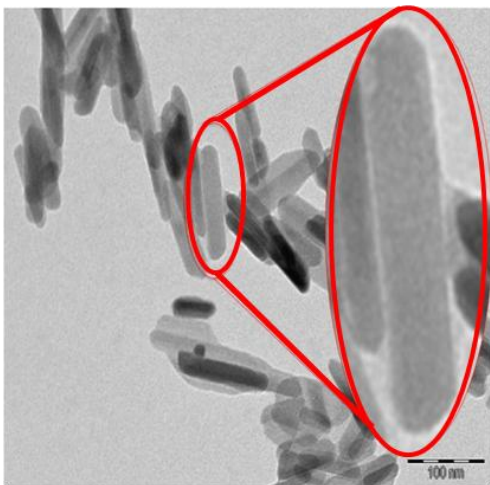
Figura 10 - Micrografias (MET) das nanopartículas sem tratamento (A), hidrotérmicamente tratadas em solução  $\text{NH}_4\text{Cl}$  por 2h (B) e 5 h (C) e seus respectivos gráficos de distribuição de tamanho de partícula.



(A)



(B)



(C)

Fonte: próprio autor.



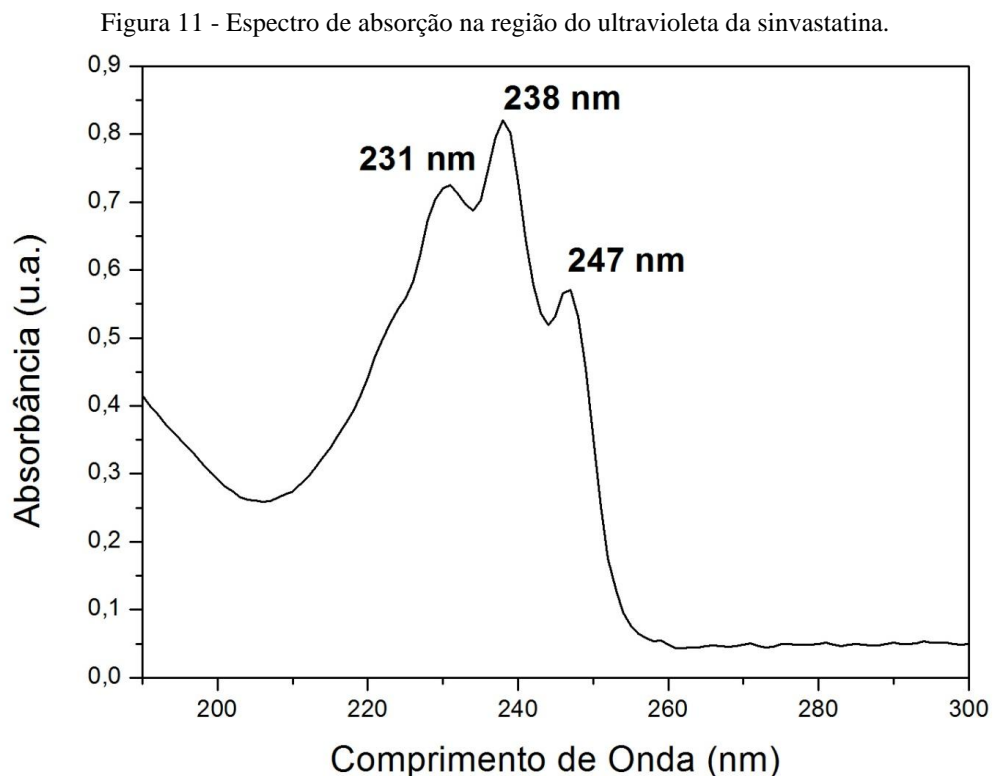
## 5.2 Caracterização da sinvastatina

A sinvastatina utilizada para adsorção na superfície da hidroxiapatita foi extraída de cápsulas comercializadas em farmácias e, posteriormente, recristalizada. Por isso, houve a necessidade de caracterização para garantir a qualidade da droga.

A avaliação de formulações magistrais de cápsulas de sinvastatina não é contemplada com metodologias analíticas em compêndios oficiais nacionais e internacionais. Para as formulações farmacêuticas industrializadas são reportados vários métodos fundamentados em diferentes técnicas analíticas para avaliar a sinvastatina, entre esses, por Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV), FTIR e análise térmica (MARKMAN; ROSA, 2011).

### 5.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

O espectro obtido na região do UV está representado na Figura 11 e são condizentes com os espectros descritos na literatura com máximos de absorção para sinvastatina em 231, 238 e 247 nm (O'NEIL, 2006).

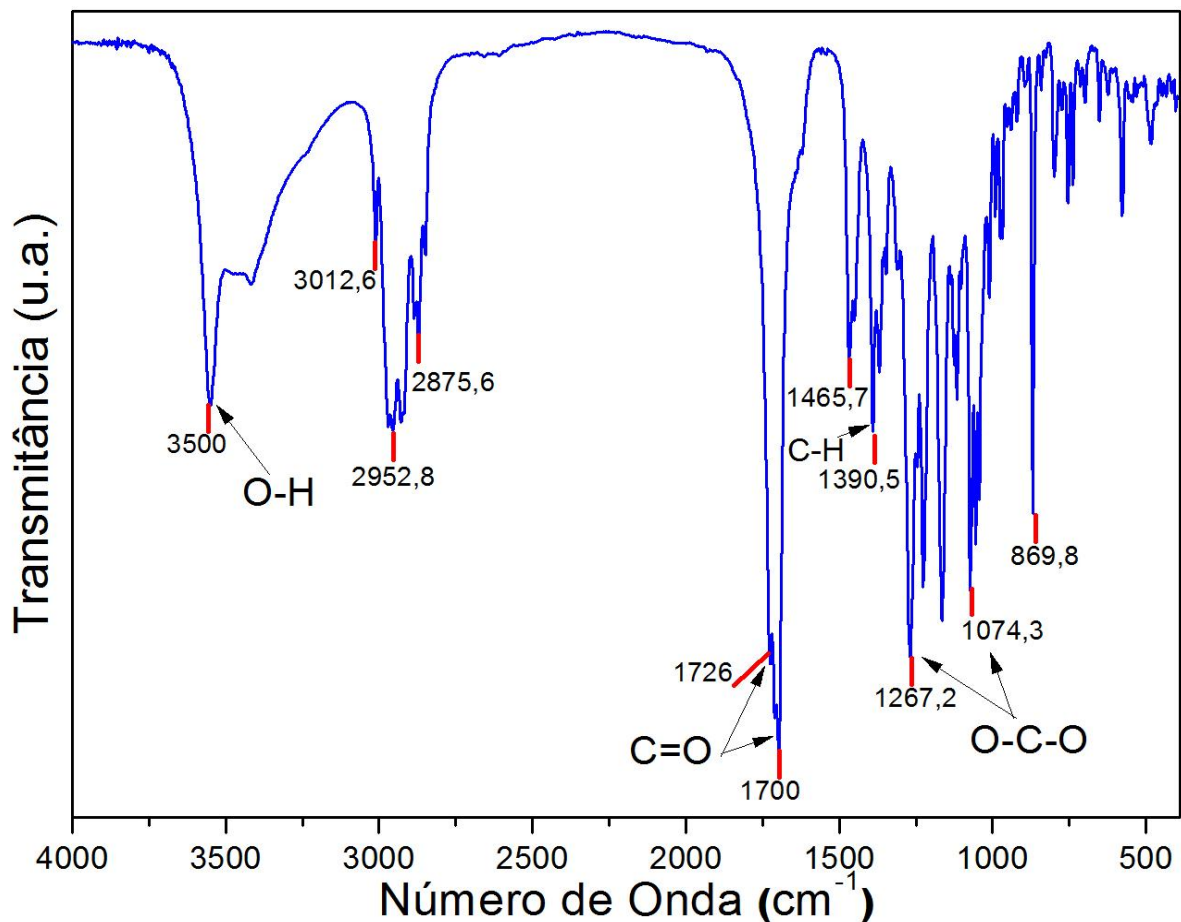


Fonte: próprio autor.

### 5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho

As principais bandas na região do infravermelho descritas para sinvastatina estão localizadas nos seguintes números de ondas: 1718, 1459, 1389 e 1267  $\text{cm}^{-1}$  (MOFFAT et al., 2004). Essas bandas podem ser observadas nos espectros da Figura 12, em número de ondas aproximado. A banda em 3500  $\text{cm}^{-1}$  indica deformação axial de O-H livre. As bandas aproximadas 3012, 2952 e 2875  $\text{cm}^{-1}$  se referem a vibrações de estiramento de ligações C-H. As bandas com números de onda em torno de 1726 e 1700 indicam deformação axial C=O de éster e lactona. Em aproximadamente 1567  $\text{cm}^{-1}$  temos deformação axial de C=O de carboxilato. Em torno de 1465 e 1389  $\text{cm}^{-1}$ , deformação angular de metil e metileno. Nas bandas observadas em 1267 e 1074  $\text{cm}^{-1}$ , temos a deformação axial de C-O-C de éster e lactona. As bandas observadas em 1160 e 1182  $\text{cm}^{-1}$ , podem ser atribuídas à deformação angular da espécie O-H (TANDALE; JOSHI; GAUD, 2011).

Figura 12 - FTIR da sinvastatina recristalizada.



Fonte: próprio autor.

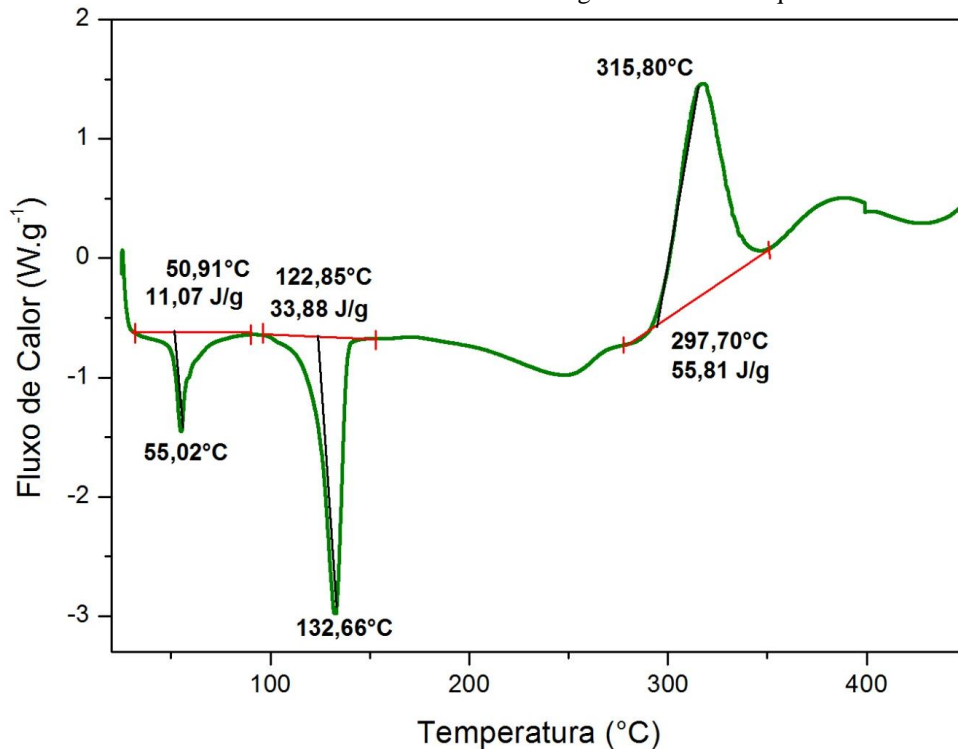
### 5.2.3 Calorimetria exploratória diferencial

Vários estudos relacionados à aplicação de análises térmicas na caracterização, avaliação de pureza, compatibilidade de formulação farmacêutica, identificação de polimorfismo, estabilidade e decomposição térmica de fármacos e medicamentos encontram-se descritos na literatura (OLIVEIRA; YOSHIDA; LIMA GOMES, 2011).

A sinvastatina foi caracterizada termicamente através de DSC que é uma técnica utilizada para medir a diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. Na área farmacêutica é utilizada na caracterização térmica e determinação da pureza de fármacos (OLIVEIRA et al., 2011).

A curva DSC da sinvastatina (Figura 13) demonstra o primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura a partir de 50,91°C, com um consumo de energia de 11,07 J.g<sup>-1</sup>, que provavelmente se refere ao ponto de ebulição do solvente utilizado na recristalização, no caso, a acetonitrila. O segundo evento, característico do processo de fusão da substância, sinvastatina, se inicia em 122,85°C, com um consumo de energia de 34,88 J.g<sup>-1</sup>. Sendo assim, de acordo com a curva, a sinvastatina apresentou temperatura de fusão em 132,66°C.

Figura 13 - Curva DSC da sinvastatina em atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10°C/min.



Fonte: próprio autor.

A determinação do grau de pureza da sinvastatina foi realizada através de DSC, utilizando a Equação de van't Hoff na faixa de fusão do fármaco (OLIVEIRA, M. A. D. et al., 2010).

A determinação do ponto de fusão utilizando métodos calorimétricos vem sendo bastante empregada como método de avaliação do grau de pureza de fármacos (RODRIGUES et al., 2005). A avaliação da pureza por DSC pode ser realizada pelo simples acompanhamento visual da curva DSC, observando a presença dos eventos térmicos característicos do fármaco, ou utilizando uma determinação quantitativa pelo método da Equação de van't Hoff (2). Este último determina a pureza a partir da faixa de fusão do analito, podendo, assim, determinar a fração molar de impurezas contidas neste material (OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2005).

$$T_f = T_0 - X \cdot \left( \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} \right) \quad (2)$$

onde  $T_f$  representa a temperatura de fusão das impurezas no processo de fusão,  $T_0$  o ponto de fusão do maior componente expresso em Kelvin (K),  $R$  a constante dos gases ( $8,3143 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), a concentração molar das impurezas na fase líquida e  $\Delta H_f$  o calor de fusão do maior componente expresso em  $\text{J mol}^{-1}$  (RODRIGUES et al., 2005).

Quando uma substância é submetida a um aquecimento, o conjunto das impurezas é fundido formando no sistema uma fase líquida. Acima desta temperatura então, a fase sólida consiste somente em substância pura (FORD; TIMMINS, 1989). Quando a fase eutética das impurezas é formada a temperatura decresce fazendo com que a fração molar das impurezas na fase líquida seja constantemente diminuída desde que a substância pura dissolva na solução eutética. A equação (3) descreve esta relação (RODRIGUES et al., 2005).

$$X = \frac{x_1}{F} \quad (3)$$

Onde  $\frac{x_2}{F}$  é a fração molar das impurezas na fase líquida.

A equação (3) pode ser substituída na equação (2) dando origem a uma expressão (4) que descreve a relação linear entre temperatura de fusão das impurezas ( $T_f$ ) e fração molar das impurezas:

$$T_f = T_0 - \frac{x_1}{F} \cdot \left( \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} \right) \quad (3)$$

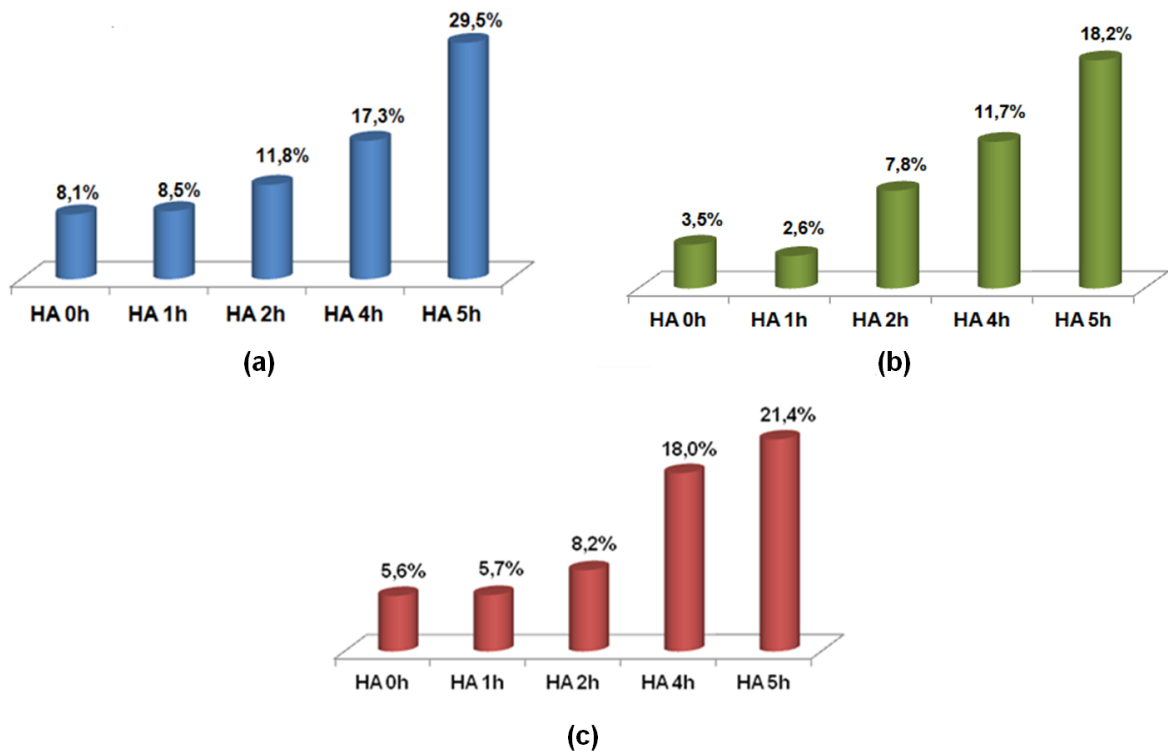
Na avaliação de pureza absoluta pelo método da Equação de van't Hoff, sabe-se que quanto maior a concentração de impurezas na amostra, menor é o ponto de fusão e mais larga é a faixa de fusão (OLIVEIRA et al., 2011).

O ponto de fusão da sinvastatina, de acordo com a literatura, varia entre 135-138°C. (SAEED ARAYNE et al., 2009). Logo, a pureza da sinvastatina recristalizada mostrou-se em torno de 94,37 a 97,53%.

### 5.3 Adsorção da sinvastatina na superfície da HA

Os testes de adsorção foram realizados, primeiramente, com as cinco amostras preparadas: HA0h, HA1h, HA2h, HA4h e HA5h. A quantidade (em porcentagem) de sinvastatina adsorvida que inicialmente estava presente na solução em acetonitrila pode ser observada na Figura 14. Para as três diferentes concentrações, é evidente que, para as amostras de HA obtidas com maior tempo de tratamento hidrotérmico, há uma maior capacidade de reter a droga em sua superfície.

Figura 14 - Testes de adsorção na superfície da HA variando a concentração de sinvastatina: (a) 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , (b) 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e (c) 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



Fonte: próprio autor.

Fosfatos de cálcio são materiais altamente porosos devido a espaços livres entre os cristais precipitados, com tamanho de poro em escala nano / micrométrica (ESPANOL et

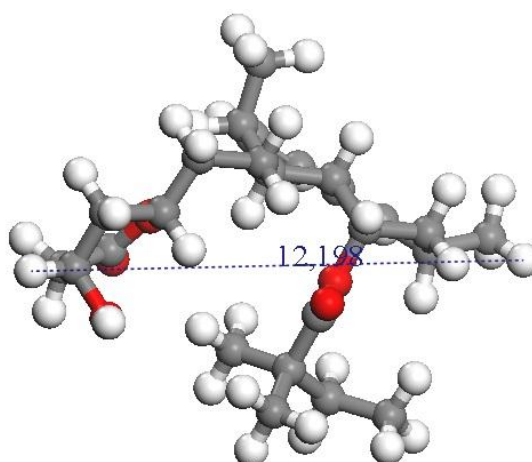
al., 2009). A sua porosidade inerente torna esses materiais bons transportadores em sistemas de libertação controlada de drogas. Contudo, não apenas o total da porosidade interligada é relevante para o carregamento e entrega de drogas, mas também as dimensões dos poros e da distribuição de tamanho de poro no grão, assim como a sua área superficial específica e a interação adsorvente/adsorbato (GINEBRA et al., 2012).

A partir dos valores expostos na Tabela 4, foi discutido que a área superficial diminui à medida que o tempo de tratamento hidrotérmico aumenta. Esperava-se, portanto, que a adsorção do fármaco fosse maior nas amostras de menor tamanho de partícula e, conseqüentemente, maior área superficial.

Na Figura 9, as curvas de distribuição de diâmetro de poro evidenciam uma maior concentração de poros na região designada a mesoporosidade. Contudo, à medida que o tempo de tratamento hidrotérmico aumenta, as curvas tendem a se distribuir em direção à região correspondente a escala de microporos.

Apesar da HA apresentar porosidade ideal para adsorver moléculas, a natureza hidrofílica da sua superfície possibilita uma fácil dessorção de drogas hidrofóbicas (LUO et al., 2010). Sendo assim, sugere-se que as moléculas de sinvastatina adsorvidas em mesoporos da superfície das amostras de HA são mais facilmente liberadas, enquanto que ficam ‘aprisionadas’ nos microporos, com menores diâmetros. Da Figura 15 (obtida através do programa Materials Studio 5.0), temos que o diâmetro médio da molécula de sinvastatina é aproximadamente 1,2 nm, confirmando a possibilidade de serem mais dificilmente liberadas dos poros com diâmetro entre 1 e 5 nm presentes na HA5h (Figura 9).

Figura 15 - Diâmetro médio da molécula de sinvastatina.

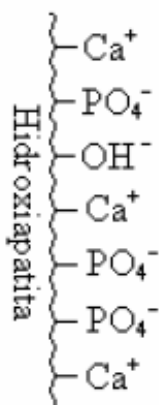


Fonte: próprio autor.

Esse resultado torna a HA5h a melhor amostra entre as demais diante da aplicação. Pode-se supor que as moléculas da droga adsorvidas fracamente nos mesoporos seriam inicialmente liberadas, enquanto as “aprisionadas” nos microporos teriam posterior liberação, simultânea com o processo de biodegradação da cerâmica. Esse comportamento possibilitaria um controle ideal da liberação do fármaco.

Além disso, deve-se considerar a interação adsorvente/adsorbato. Em um modelo simplificado, pode-se representar a HA como um conjunto de grupos funcionais, onde os pares de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), que podem se comportar com sítios ácidos de Lewis e como aglomerados de átomos de oxigênio carregados negativamente que, por sua vez, constituem os íons fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) podendo se comportar com sítios básicos de Lewis. As hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) se apresentam distribuídas sobre a superfície do cristal, podendo se comportar com sítios básicos de Brönsted. Na Figura 16, temos uma representação esquemática dos grupos funcionais da HA (GONÇALVES, 2007).

Figura 16 - Representação esquemática dos grupos funcionais da superfície da HA.



Fonte: (GONÇALVES, 2007).

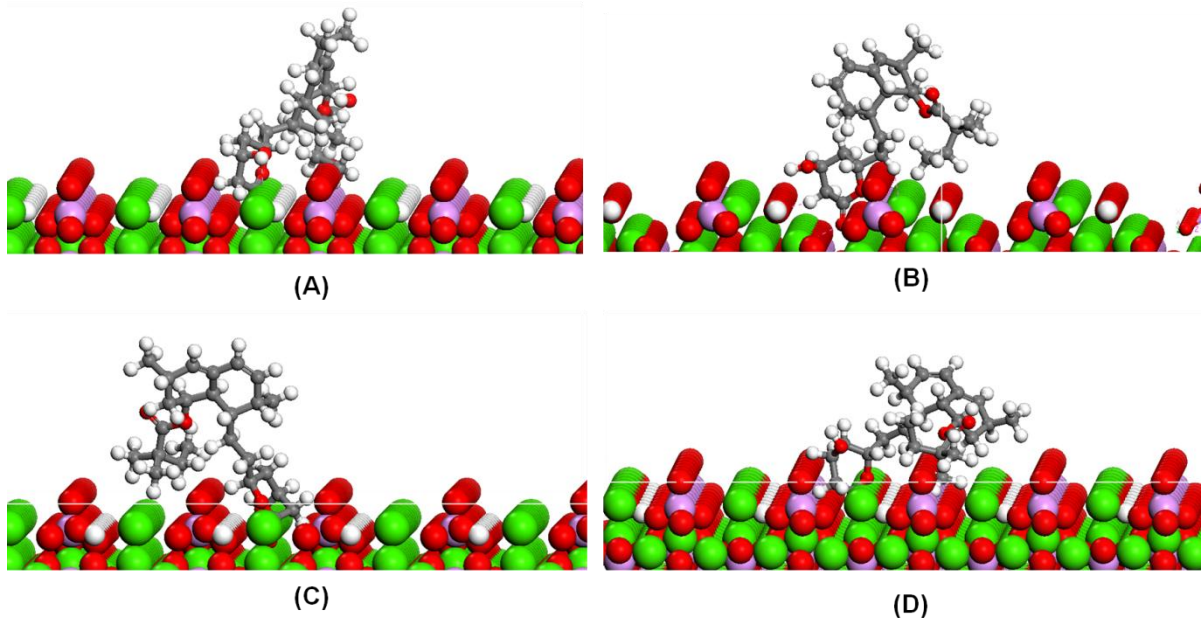
Em acetonitrila, um solvente não prótico, a sinvastatina comporta-se como uma molécula neutra. Portanto, pode-se afirmar que as interações eletrostáticas são relativamente fracas entre a superfície de HA e a sinvastatina.

Ensaio teóricos foram realizados simulando a interação HA-SINV<sup>1</sup>. A Figura 17 ilustra, de acordo com os cálculos teóricos, a adsorção da molécula da sinvastatina na superfície da HA. Mostra, basicamente, que as interações são similares e que a droga forma um quelato nas deformidades da superfície da NP.

<sup>1</sup> Não foram realizados ensaios teóricos para a amostra HA 5h por motivos técnicos.

As interações são feitas pela região dos oxigênios, deixando os carbonos mais expostos. Caso as simulações sejam feitas na presença de solvente a orientação dos mesmos pode se modificar, ou não, uma vez que a superfície também é polar.

Figura 17 - Interação HA-SINV com base em cálculos teóricos: HA 0h (A), HA 1h (B), HA 2h (C) e HA 4h (D).

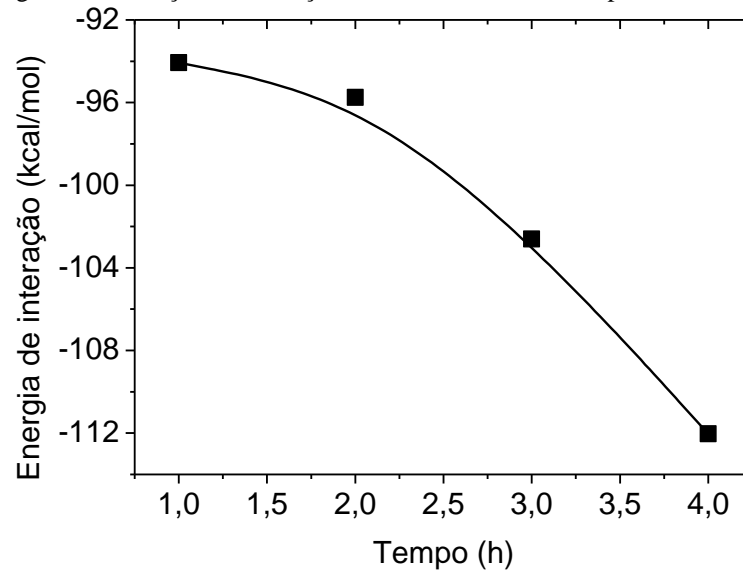


Fonte: próprio autor.

O gráfico da Figura 18 relaciona a energia de adsorção entre a droga e a NP com base também em cálculos teóricos. À medida que aumenta o tempo de tratamento hidrotérmico, a energia de adsorção diminui e, conseqüentemente, a força de interação se torna maior. Apesar das cargas superficiais não se alterarem significativamente (Tabela 5), pode-se dizer que o grau de imperfeições na superfície varia de acordo com o tempo de tratamento já que houve variação na energia de adsorção. Sugere-se que a posição dos átomos de hidrogênio na superfície das nanopartículas varia de acordo com o tratamento.



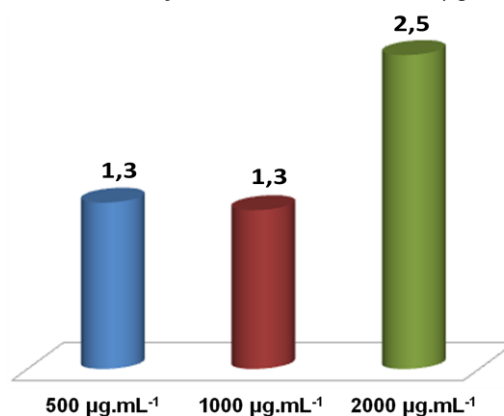
Figura 18 - Relação da interação da sinvastatina com a superfície de HA.



Fonte: próprio autor.

Sendo a capacidade de carga da amostra HA 5h maior, temos na Figura 19 uma representação que permite comparar a massa de SINV adsorvida (mg) por massa (g) de HA nas três diferentes concentrações da droga em que foram realizados os testes. Pode-se concluir que a solução com maior concentração promove maior quantidade de droga adsorvida, indicando que não houve saturação dos sítios.

Figura 19 - Comparativo de massa (mg) de SINV por massa (g) de HA 5h para testes de adsorção com soluções com concentrações de 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



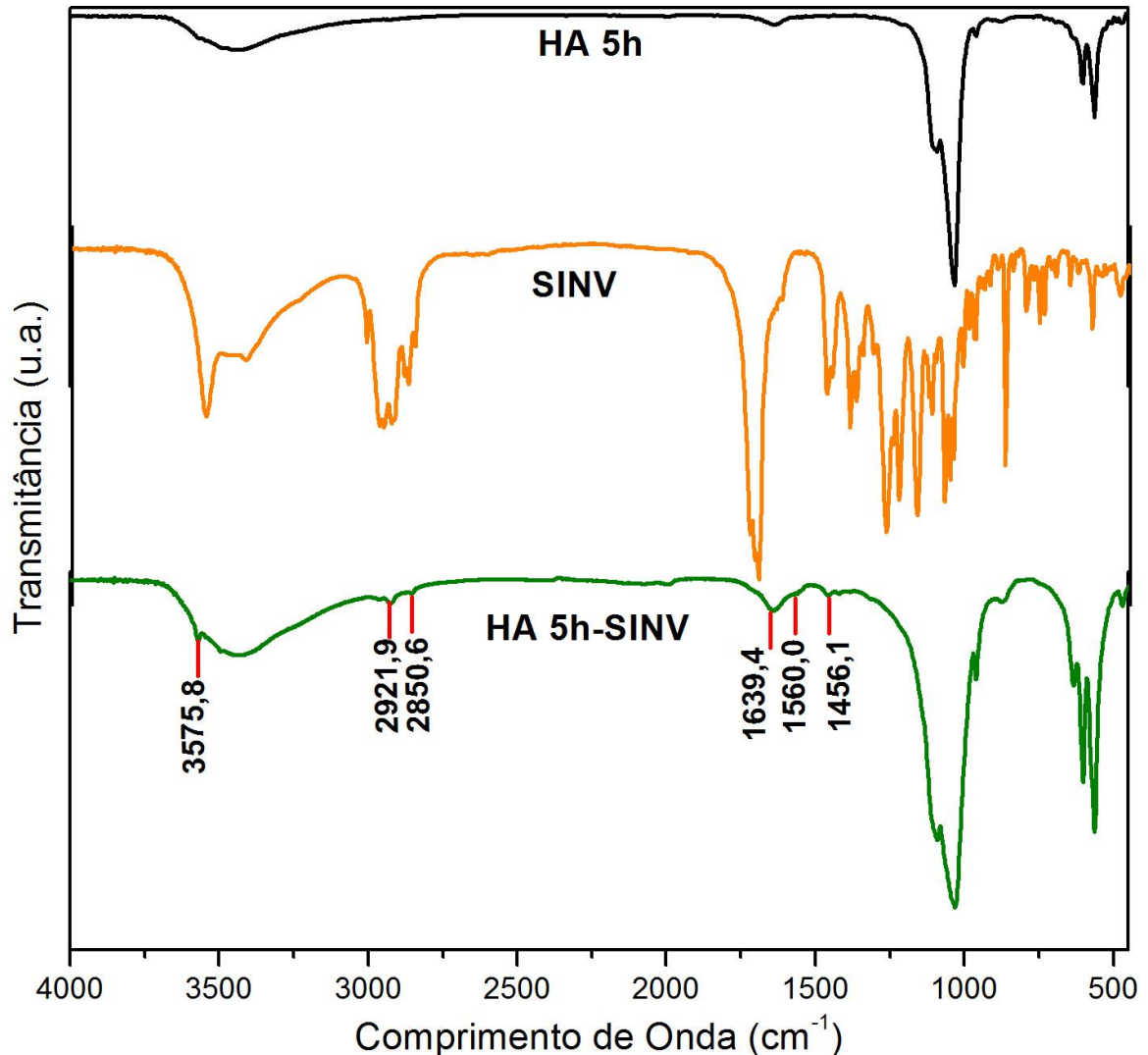
Fonte: próprio autor.

Como descrito no subitem 5.2.2, bandas características da molécula de sinvastatina podem ser observadas no espectro da Figura 20, em número de ondas aproximado. Mesmo algumas bandas tendo ficado sobrepostas as da HA, algumas das principais indicam a presença do fármaco na amostra. Por exemplo, as bandas em torno de

2921,9 e 2850,6  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a vibrações de estiramento de ligações C-H (TANDALE et al., 2011).

Apesar de não ser uma técnica quantitativa, a relativa baixa intensidade das bandas nos espectros de FTIR atribuídas a sinvastatina está relacionada à maior quantidade em massa de hidroxiapatita (2,5 mg de SINV para cada grama de HA).

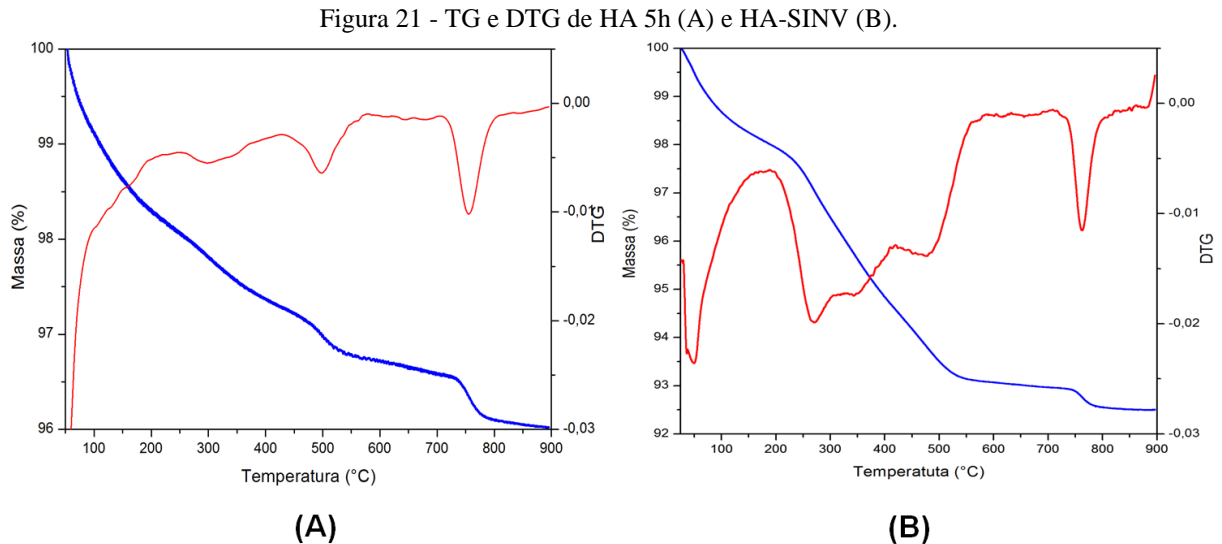
Figura 20 - FTIR da HA 5h com SINV adsorvida em sua superfície.



Fonte: próprio autor.

Na Figura 21, estão expostas as curvas termogravimétricas para a amostra HA 5h e HA 5h-SINV. A amostra HA 5h, por ser um material de estabilidade térmica considerável, apresentou perda de massa de 3,98% correspondendo, em maior parte, à água adsorvida na superfície e água estrutural. Para a amostra com SINV adsorvida em sua superfície, a massa eliminada foi de 7,49%. Observa-se que a mais expressiva perda de massa se iniciou em aproximadamente 200°C e se estendeu até 700°C. Para a SINV pura, a degradação se inicia a

aproximadamente 200°C e vai até 400°C (OLIVEIRA, M. A. D. et al., 2010). Este pequeno prolongamento da perda de massa observada no termograma pode ser associada à interação nos microporos da nanopartícula somada à própria massa eliminada da água estrutural da HA, que é mínima nessa faixa de temperatura.



Fonte: próprio autor.

#### 5.4 Modificação da superfície da HA com ácido oleico

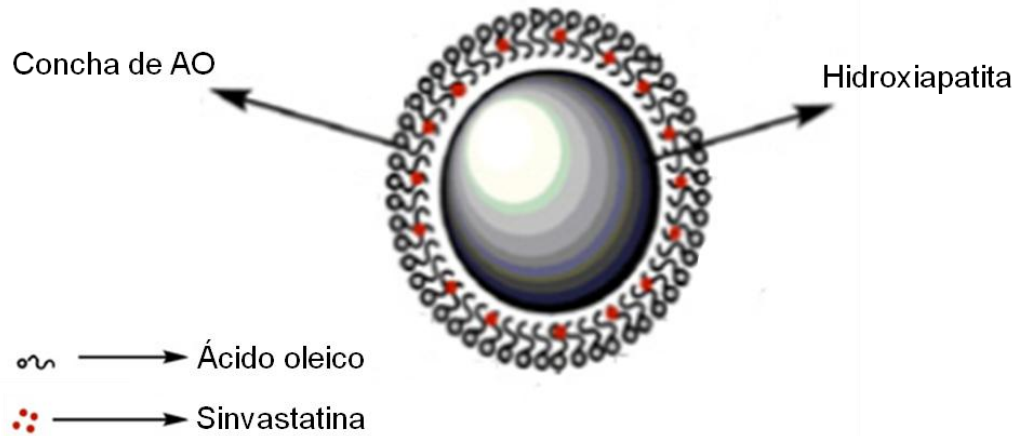
Apesar de nanopartículas de HA apresentarem características ideais como substituinte ósseo, estudos anteriores demonstram que drogas são quimicamente conjugadas ou ionicamente adsorvidas em sua superfície, mas resulta em uma capacidade limitada e rápida liberação controlada. Isso porque a natureza hidrofílica da superfície das nanopartículas de HA torna desafiador usá-las em um sistema de liberação de drogas hidrofóbicas, como é o caso da sinvastatina (LUO et al., 2010). Portanto, visando um sistema eficiente e de liberação mais controlada, a superfície de HA foi funcionalizada com ácido oleico ( $C_{18}H_{34}O_2$ , AO).

De acordo com resultados morfológicos anteriores e testes de adsorção realizados com sinvastatina, a amostra HA5h apresenta morfologia mais semelhante ao do componente mineral natural dos ossos e maior capacidade de adsorção. Sendo assim, escolheu-se essa amostra para desenvolver um sistema representado por HA-AO-SINV.

LUO et al. (2010) sugere que o nanocristal forma um núcleo envolvido por uma monocamada, semelhante a uma “concha”, de moléculas de AO quimicamente adsorvidas,

enquanto as moléculas do fármaco ancoram nos interstícios formados pelas longas cadeias carbônicas do ácido oleico, como mostra o esquema na Figura 22.

Figura 22 - Representação esquemática do sistema HA-AO-SINV.



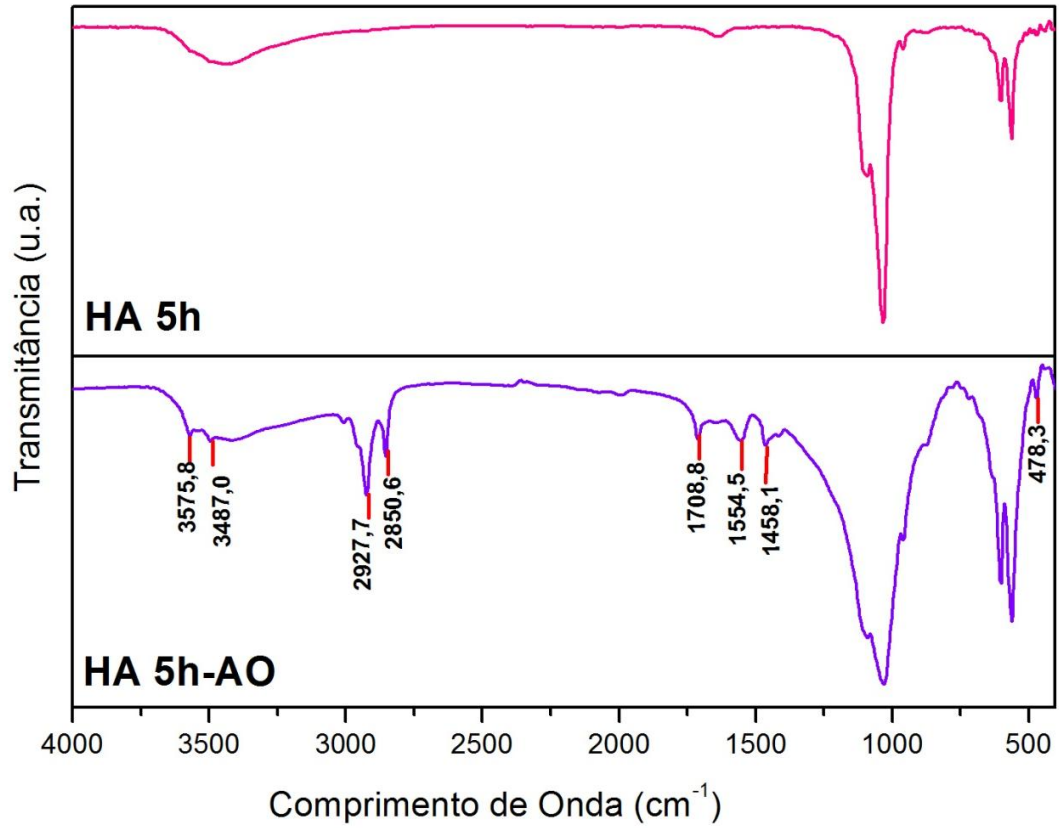
Fonte: adaptado de (LUO et al., 2010).

O espectro de FTIR na Figura 23, em que a amostra modificada com ácido oleico é designada HA5h-AO, indica que ocorreu a ligação química entre a superfície da HA (coberta por hidroxilas) e as moléculas de ácido oleico. Este fato é evidenciado pela ausência da intensa banda referente ao estiramento  $\nu$  (C=O) de ácido oleico puro (Figura 24), aproximadamente em  $1711\text{ cm}^{-1}$ , no espectro de FTIR da amostra revestida com AO (MA et al., 2011). Em vez disso, duas bandas características aparecem em  $1554$  e  $1458\text{ cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídas aos estiramentos assimétrico ( $\nu_{\text{as}}\text{ COO}-$ ) e simétrico ( $\nu_{\text{s}}\text{ COO}-$ ), respectivamente. Como  $\Delta \approx 96\text{ cm}^{-1}$ , indicando que a cadeia de ácido oleico é fixada numa interação bidentada com os dois oxigênios simetricamente coordenados à superfície (MA et al., 2011).

O estiramento não simétrico de metil,  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ , é visto com um ombro na banda  $2927\text{ cm}^{-1}$ . A banda seguinte e a encontrada em  $2853\text{ cm}^{-1}$ , são atribuídas aos estiramentos antissimétricos e assimétricos de metileno ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ,  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ ). A nitidez das bandas indica que as cadeias de hidrocarbonetos estão bem ordenadas. O espectro não exibe bandas em posições que indicam presença do ácido oleico puro (SÖDERLIND et al., 2005).

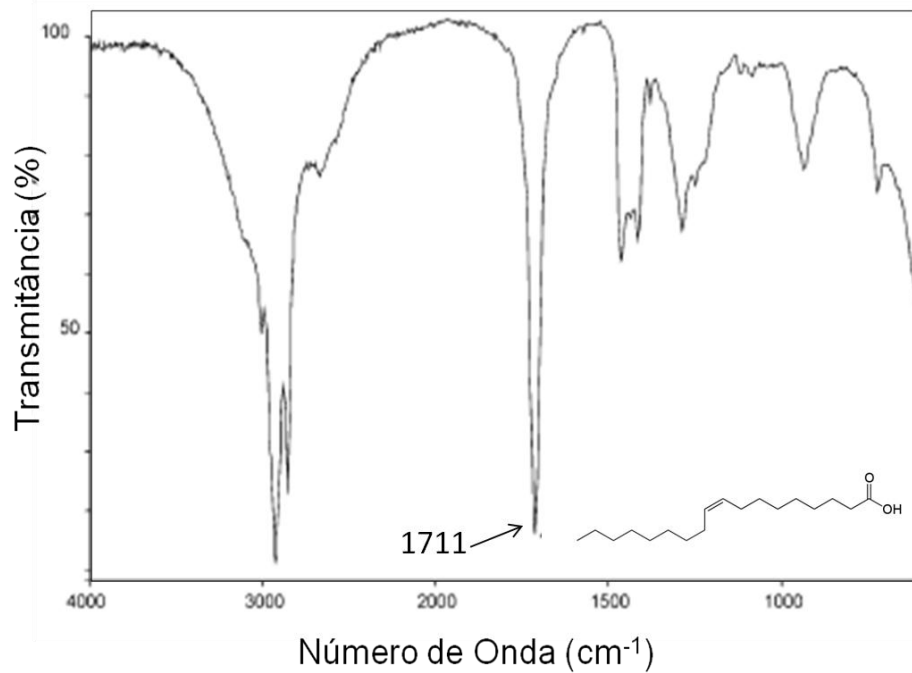
Portanto, de acordo com os espectros de FT-IR, pode-se afirmar que o ácido oleico recobriu a superfície dos nanocristais com sucesso, o que pode promover uma maior facilidade de dispersão em solventes não polares (MA et al., 2011).

Figura 23 - FTIR das amostras HA 5h e HA 5h-AO.



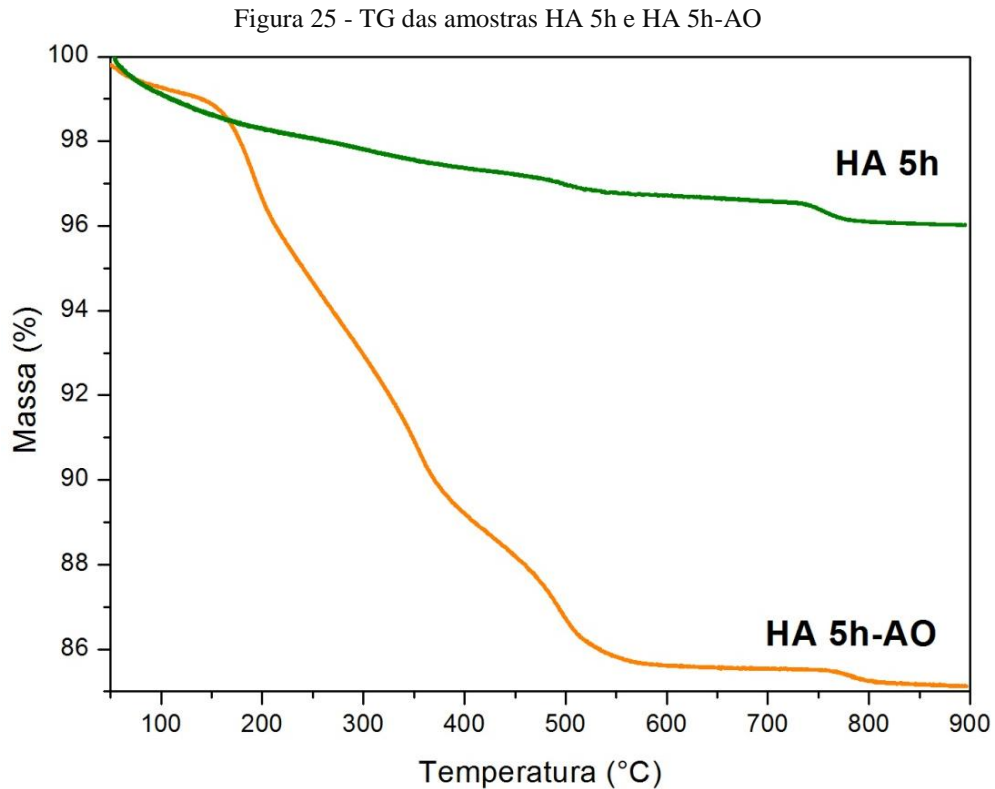
Fonte: próprio autor.

Figura 24 - FTIR do ácido oleico puro.



Fonte: adaptado de (SÖDERLIND et al., 2005).

Além do estudo através do FTIR, também se realizou uma análise termogravimétrica (TG) da amostra modificada para verificar a presença de moléculas de oleato através do evento de perda de massa. Desta forma, a Figura 25 mostra os termogramas das amostras sem e com modificação superficial, respectivamente.



Fonte: próprio autor.

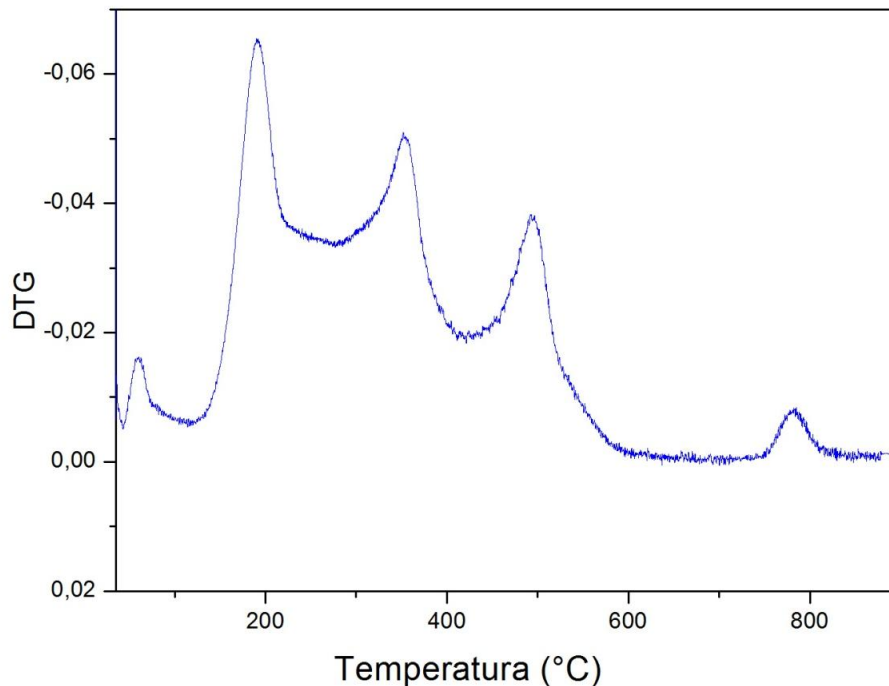
O primeiro termograma indica que até 900 ° C, a perda de massa da HA é de 3,9% da inicial. Além disso, neste termograma constata-se a estabilidade desta cerâmica a temperaturas elevadas (GRANDE et al., 2009). Na primeira e maior perda a massa eliminada foi de 2,68%, ocorrendo até aproximadamente 400°C. Inicialmente, a perda corresponde a termodessorção da água da superfície da NP. Próximo de 200°C, a perda de massa é atribuída à eliminação de H<sub>2</sub>O estrutural da rede cristalina. Essa longa faixa de temperatura em que ocorre perda de massa indica que a água não interage de maneira uniforme com a estrutura, o que é compatível com a existência de diferentes sítios estruturais. Entre 500 e 600°C, observa-se uma perda de massa de 0,67% e, entre 700 e 800°C, uma perda de 0,6% que são atribuídas à eliminação de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> presentes na amostra, como se observou na Figura 8 (BARAKAT et al., 2008).

A perda total de massa para a amostra modificada com ácido oleico foi de 14,88%. A ligeira perda de massa observada abaixo de 200°C indica algumas moléculas de

H<sub>2</sub>O adsorvidas na superfície da amostra HA 5h-AO. Um evento térmico observado entre 200 e 400°C pode ser atribuído a dessorção das moléculas de ácido oleico. No entanto, a eventual perda de massa acima de 400 °C pode indicar interações distintas entre as moléculas de oleato e os átomos superficiais, conduzindo a diferenças nas intensidades dessas interações.

A curva DTG (Figura 26) apresenta três eventos exotérmicos entre 200 e 500°C. A presença de moléculas fortemente ligadas retarda a decomposição daquelas que estão fortemente ligadas à superfície. Portanto, o primeiro evento nessa faixa pode ser atribuído à decomposição das espécies fisissorvidas enquanto que o segundo é relativo a eliminação das espécies quimissorvidas. O terceiro evento está relacionado a perda de massa da HA (água estrutural) (Figura 21-A).

Figura 26 - DTG da amostra HA-AO.

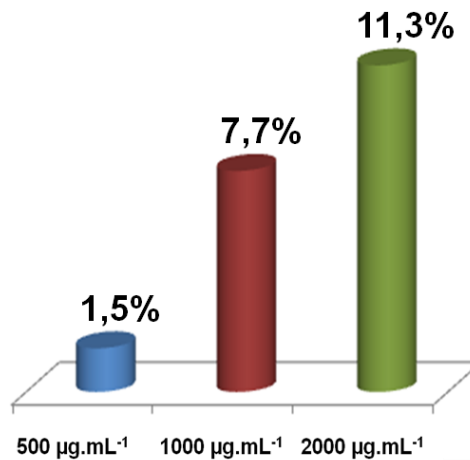


Fonte: próprio autor.

### 5.5 Incorporação da sinvastatina em HA-AO

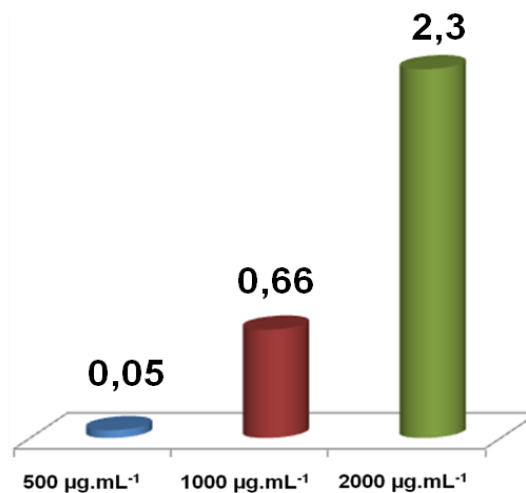
A quantidade de sinvastatina incorporada à amostra HA-AO está exposta em dois gráficos comparativos nas Figuras 27 e 28. A tendência de maior capacidade de carga foi observada novamente para a amostra que foi submetida ao contato com a solução de maior concentração de SINV. Contudo, em relação à adsorção direta na superfície de HA5h, houve uma queda na massa de droga incorporada a nanopartícula quando a solução tem baixa concentração de adsorvente.

Figura 27 - Porcentagem de SINV incorporada em HA-AO para soluções com diferentes concentrações de sinvastatina.



Fonte: próprio autor.

Figura 28 - Comparativo de massa (mg) de SINV por massa (g) de HA-AO para testes de incorporação com soluções de diferentes concentrações.



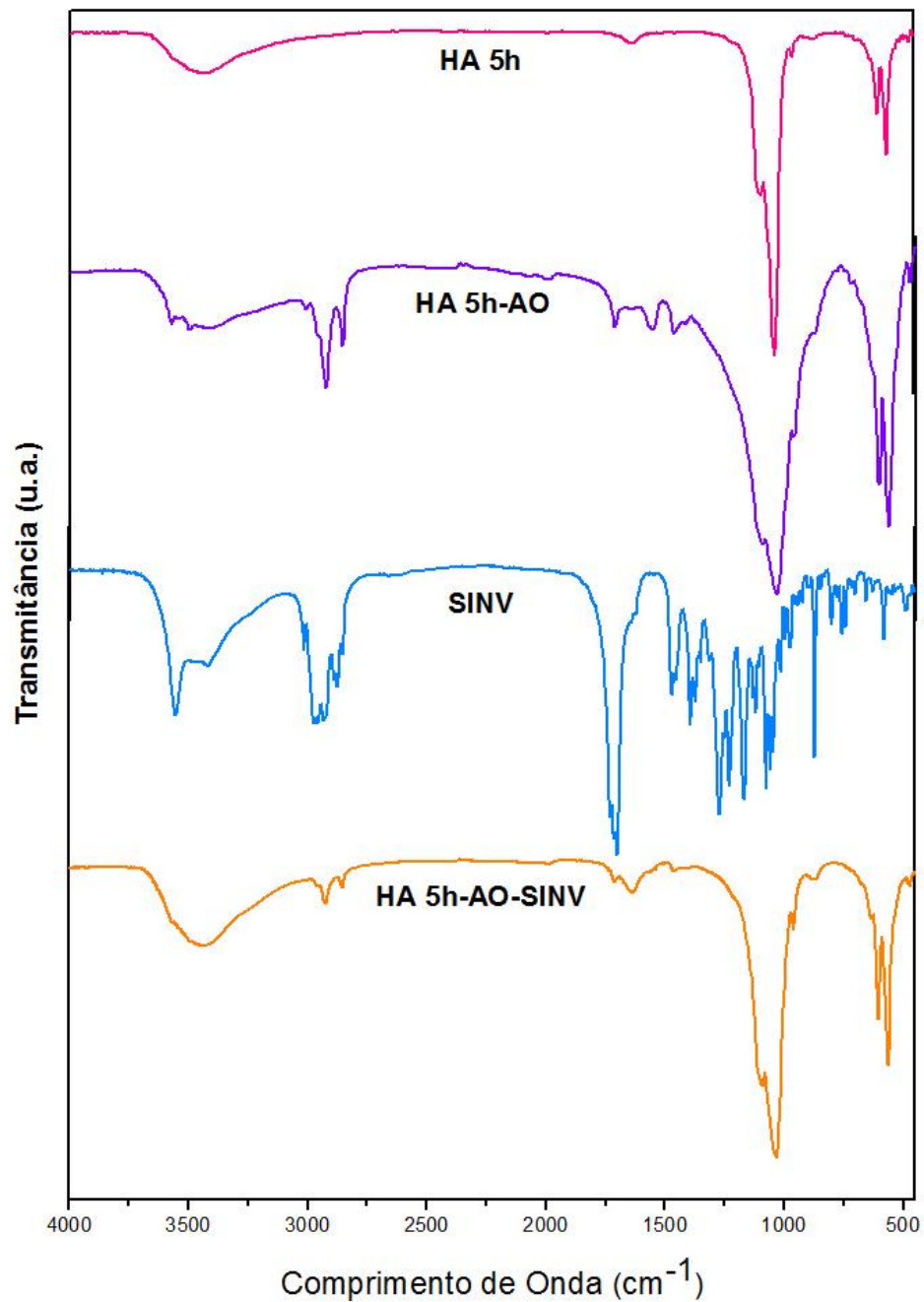
Fonte: próprio autor.

No caso das amostras em contato com a solução SINV 2000 µg.mL<sup>-1</sup>, a massa da droga incorporada se aproximou bastante com o resultado obtido para a adsorção direta na superfície HA 5h. Pode-se concluir que, para o sistema HA-AO, a incorporação de fármaco é favorecida em concentrações relativamente elevadas.

O espectro de FTIR do sistema HA-AO-SINV (Figura 29) apresenta uma sobreposição de bandas atribuídas ao AO e a SINV, impossibilitando a avaliação das interações entre as substâncias. Além disso, a quantidade relativamente menor do fármaco também dificulta a visualização das suas principais bandas.



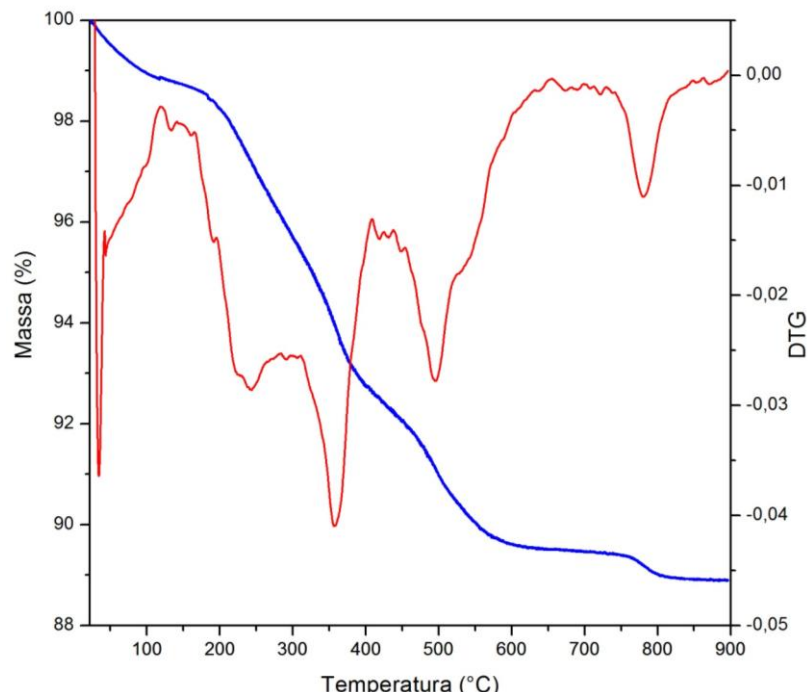
Figura 29 - FTIR do sistema HA-AO-SINV.



Fonte: próprio autor.

O termograma na Figura 30 apresenta cinco eventos principais, indicando a presença de espécies adsorvidas, com perda de massa total de 11,1%. Na faixa de temperatura, de 175-600°C, aproximadamente, na qual 9,2% da massa foram eliminados, observa-se três eventos maiores que podem ser atribuídos a decomposição de SINV e perda de ácido oleico, fraco e fortemente quimissorvido.

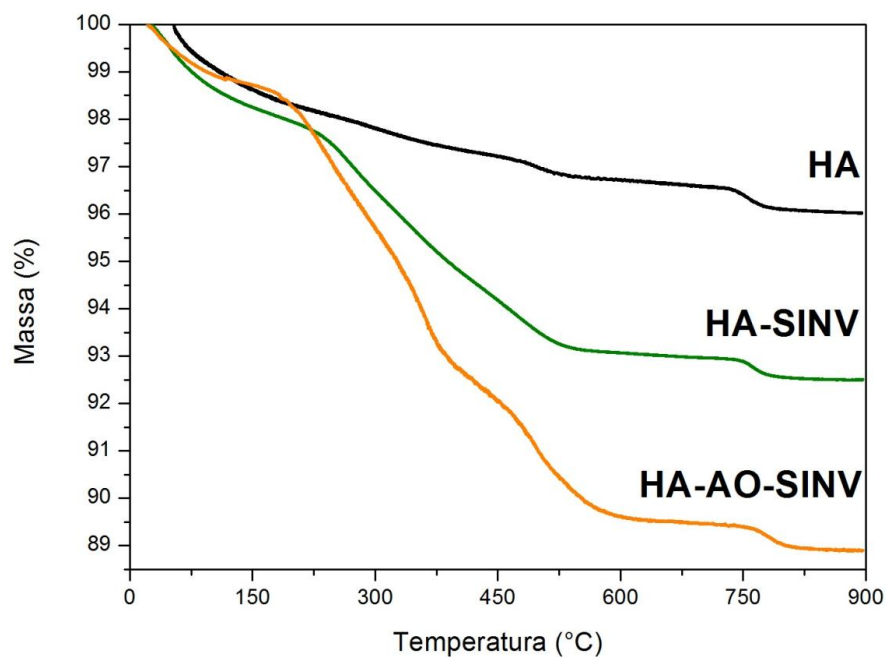
Figura 30 - TG e DTG do sistema HA-AO-SINV.



Fonte: próprio autor.

A Figura 31 exibe um comparativo entre os termogramas das três amostras, evidenciando as diferentes perdas de massa. A maior estabilidade térmica apresentada pela HA indica que a incorporação de AO e SINV a sua superfície foram realizadas com sucesso.

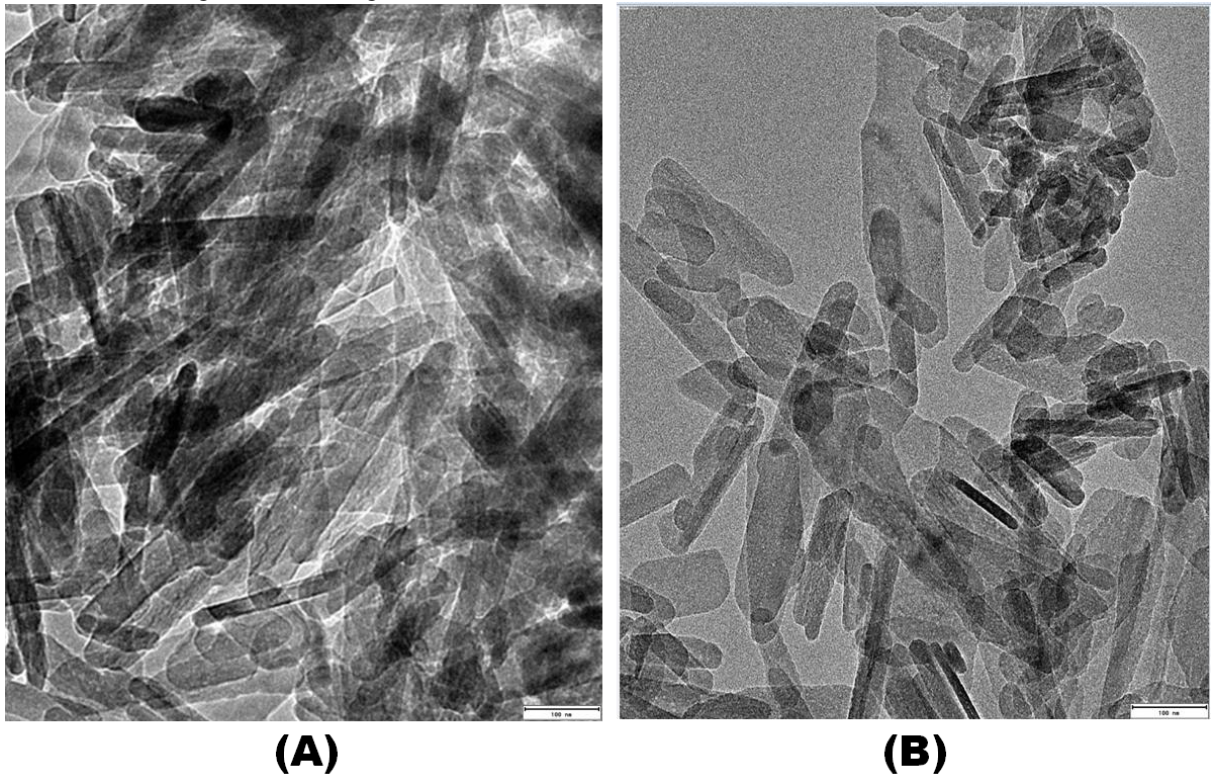
Figura 31 - Curvas de TG para HA, HA-SINV e HA-AO-SINV.



Fonte: próprio autor.

As micrografias de transmissão eletrônica das amostras HA 5h-SINV e HA 5h-AO-SINV indicam que quando não funcionalizados com ácido oleico, os cristais de HA sofrem aglomeração. Por outro lado, os grãos revestidos com o oleato se apresentam bem dispersos (Figura 32). Este resultado já era esperado, dado os valores das cargas superficiais totais encontradas para as amostras sintetizadas de HA.

Figura 32 - Micrografias das amostras HA 5h-SINV (a) e HA 5h-AO-SINV (b).



Fonte: próprio autor.

O potencial zeta é usado para determinar a estabilidade das suspensões coloidais, quando um sólido é suspenso em um líquido. Coloides com valores de PZ altos (positivos ou negativos) são eletricamente estáveis, enquanto coloides com baixo potencial zeta tendem a coagular ou flocular (GONÇALVES, 2007). Portanto, o interesse em estudar o ácido oleico como cobertura se deve a sua habilidade de promover uma melhor estabilidade coloidal em aplicações biológicas. Assim, o método de adsorção de AO em HA pode ser aperfeiçoado visando avaliar o desempenho do sistema HA-AO como carreador de drogas hidrofóbicas.

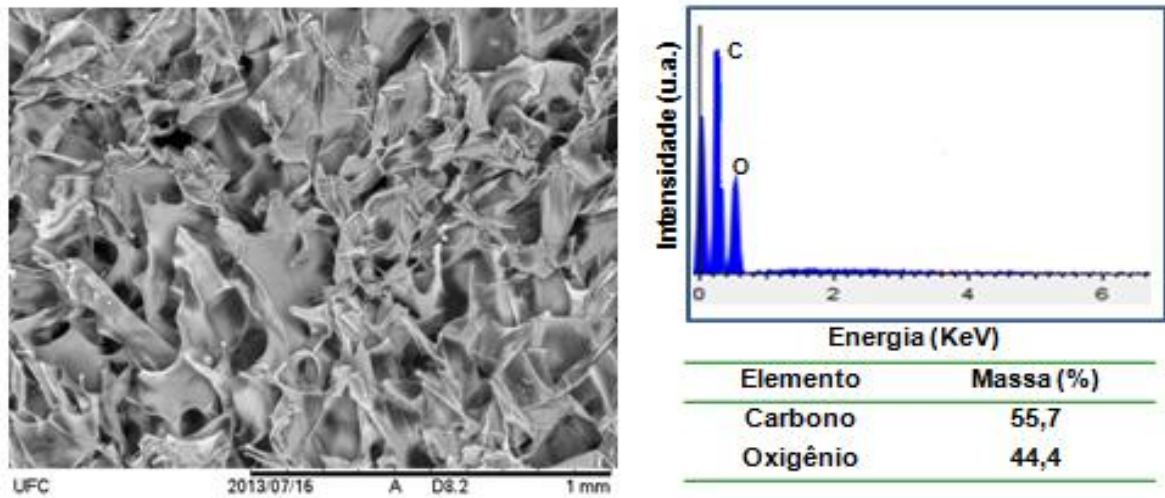
Diversos fatores podem ter influência sobre os resultados obtidos para incorporação de sinvastatina. Entre eles, a quantidade de ácido oleico adsorvida na superfície dos grãos de HA. Além disso, outros aspectos relevantes a serem considerados são o

desempenho dos dois sistemas na liberação do fármaco e o comportamento no organismo vivo.

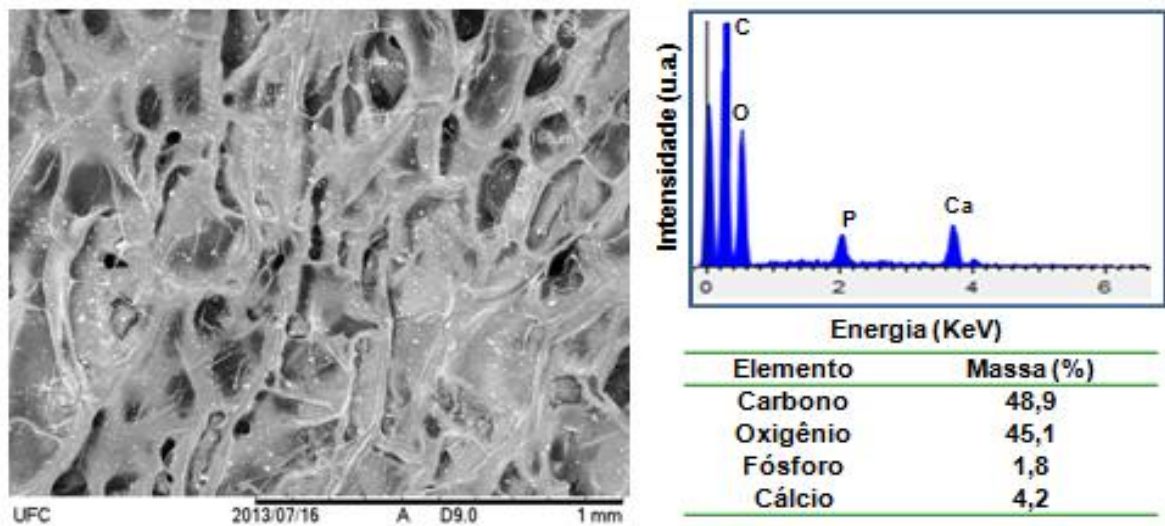
## **5.6 Biocompósito**

As imagens obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura e os espectros de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) para os “scaffolds” a base de QUIT/PEG são apresentados na Figura 32. Pode-se observar que a adição de nanopartículas de HA resultou em uma maior e mais homogênea porosidade, o que sugere que a HA atuou como um agente de ligação cruzada.

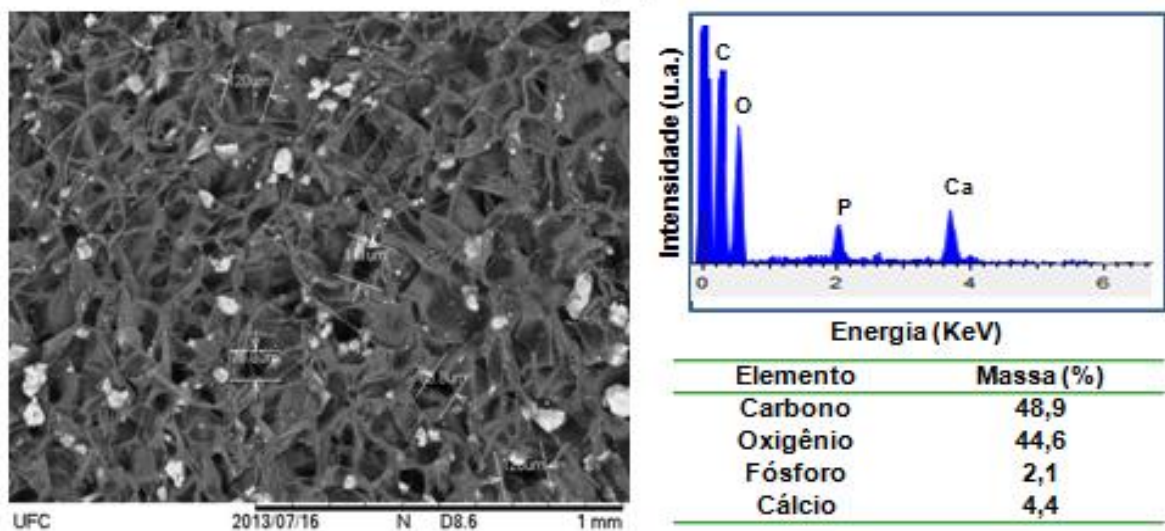
Figura 33 - Micrografia e EDS dos “scaffolds” preparados: apenas o PEG/QUIT (A), PEG/QUIT com HA (B) e PEG/QUIT com HA-SINV (C).



(A)



(B)



(C)

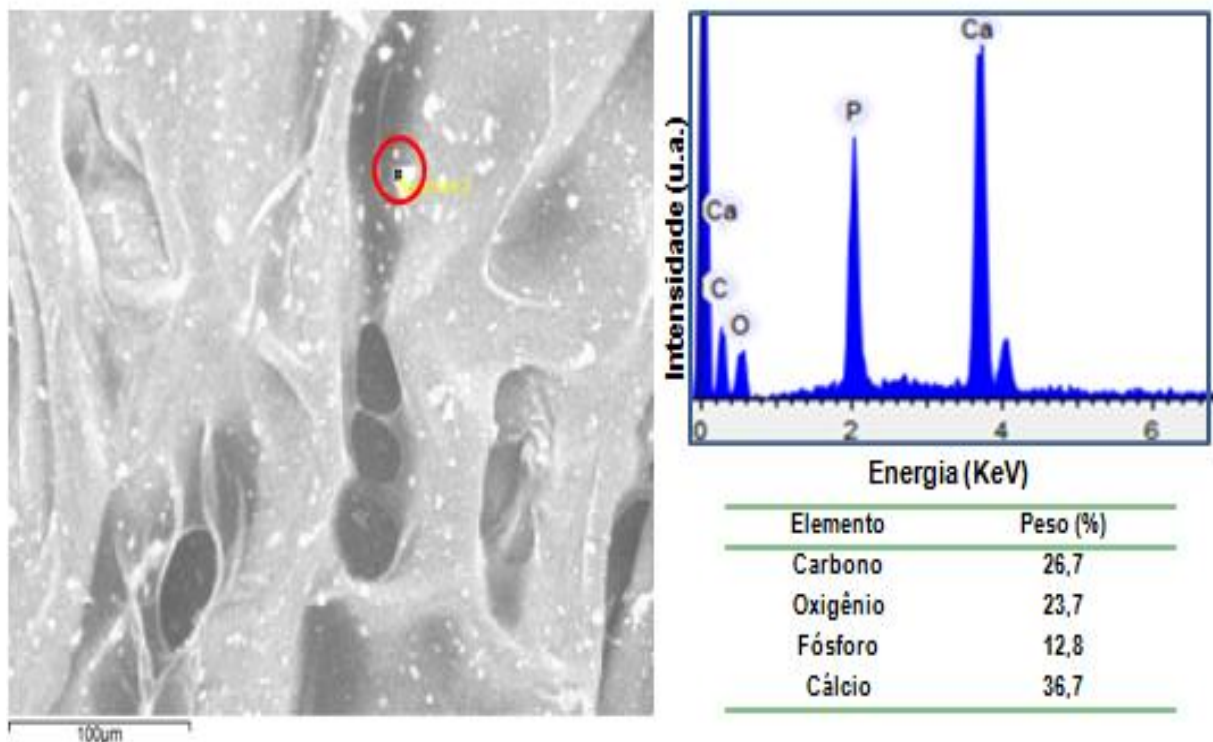
Fonte: próprio autor.

Os “scaffolds” preparados apresentaram uma estrutura tridimensional com macroporos interligados, característica essencial para aplicação na engenharia de tecidos, contribuindo para elevar a taxa de difusão e permitir a melhor vascularização. Assim, pode melhorar o transporte de oxigênio, de nutrientes e remoção de resíduos (FONTES, 2010).

Os poros desse material não têm de tamanho bem definido. Esta característica é devida ao processo de liofilização, possibilitando poros com tamanho (variando entre 50 e 200  $\mu\text{m}$ ) e morfologia não uniformes (FONTES, 2010). Um “scaffold” ideal para aplicação na engenharia de tecidos deve ter tamanho de poro maior do que uma célula em suspensão (10  $\mu\text{m}$ ) (FONTES, 2010). Alguns autores relatam que quando esta dimensão varia entre 40-100  $\mu\text{m}$ , resulta em um crescimento da matriz osteóide com sucesso e 100-350  $\mu\text{m}$  mostra uma maior regeneração óssea (FONTES, 2010). Portanto, os “scaffolds” com HA e HA-SINV têm diâmetros de poro ideais para aplicação na regeneração óssea.

O espectro de EDX da Figura 28 indica que a HA está distribuída aleatoriamente sobre a superfície do “scaffold”. Comparando com a Figura 33 (B) concluí-se que as nanopartículas também foram incorporadas homogeneamente na matriz polimérica.

Figura 34 - MEV do “scaffold” com HA e EDS da região em vermelho.



Fonte: próprio autor.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados confirmam que o método hidrotérmico é eficiente para a síntese de nanocristais de hidroxiapatita com controle de parâmetros estruturais e morfológicos. Os dados obtidos por difração de raios-x passaram por um processo de refinamento de estrutura cristalina pelo método de Rietveld que confirmaram a obtenção de HA sem fases secundárias e indicaram que a maior duração do tratamento hidrotérmico resulta no aumento de tamanho de partícula na direção do eixo-c. As microscopias de transmissão sustentaram esse resultado por apresentar cristais em prisma para as amostras submetidas ao tratamento hidrotérmico. As nanopartículas foram dispersas em  $\text{NH}_4\text{Cl}$  que funcionou com molde, produzindo um material com morfologia semelhante à HA natural do osso para assegurar o produto final uma maior biocompatibilidade.

Os espectros de FTIR revelaram bandas características da hidroxiapatita enquanto os dados obtidos por BET indicaram que a síntese permitiu também o controle das propriedades texturais. Os valores de Potencial Zeta obtidos para as nanopartículas sugerem que o tratamento hidrotérmico não altera a carga superficial da HA.

Resultados de DSC, absorvância na região do UV e infravermelho confirmaram a qualidade da sinvastatina que foi extraída de cápsulas comerciais e recristalizada.

Os testes experimentais e teóricos de adsorção de sinvastatina na superfície de HA indicaram que as nanopartículas que foram submetidas a maior tempo de tratamento hidrotérmico exibem maior interação adsorvente/adsorbato, sendo a amostra HA5h a que apresenta melhores condições para a aplicação como suporte para liberação controlada da sinvastatina.

Visando uma melhor dispersão da nanopartícula e maior estabilidade da interação com a droga, promoveu-se a quimissorção de ácido oleico na superfície da HA. Os resultados indicam que, à relativa concentração elevada, a quantidade da droga adsorvida é comparável com a fisissorção da SINV diretamente na superfície do fosfato de cálcio.

Os resultados de MEV mostraram que a adição de HA nos “scaffolds” tornou menor a organização com relação ao tamanho de poro e morfologia. As esponjas apresentaram interconectividade dos poros, que é um dos pré-requisitos para aplicação na regeneração óssea. Resultados de EDX confirmaram que a hidroxiapatita é distribuída aleatoriamente na superfície e entre as cadeias do polímero. Portanto, o nanobiocompósito desenvolvido tem grande potencial na regeneração de tecido ósseo.

## 7 PERSPECTIVAS

- Realizar o estudo cinético adsorção da sinvastatina em hidroxiapatida;
- Completar as simulações de adsorção na presença de solvente;
- Aperfeiçoar o método de funcionalização da superfície de HA com ácido oleico, avaliando à proporção que resultará em uma maior quantidade de sinvastatina ancorada no sistema carreador;
- Complementar a caracterização dos “scaffolds” com TG, DTG, DSC e FTIR;
- Realizar o estudo das propriedades mecânicas dos biocompósitos;
- Teste de liberação controlada do fármaco para bioatividade, biodegradação e biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* para avaliação do desempenho dos sistemas HA-SINV e HA-AO-SINV;
- Verificar o desempenho dos biocompósitos com diferentes combinações de outros polímeros.



## 8 PUBLICAÇÕES NO PERÍODO DE MESTRADO

### 8.1 Artigo Submetido

- NETO, D. M. A.; CARVALHO, E. V.; CUNHA, A. P.; MELE, G.; CARBONE, L.; MAZZETTO, S. E.; RICARDO, N. M. P. S.; FECHINE, P. B. A. Novel scaffolds obtained from hydroxyapatite nanoparticles and galactomannan for tissue engineering (2013).

### 8.2 Trabalhos/resumos publicados em anais de congresso

- CARVALHO, E.V.; COSTA, V. M.; NETO, D. M. A.; CHAVES, A. V.; CÂNDIDO, M. C. L.; SOUZA, N. D. G.; MARTINS, D. V.; FECHINE, P. B. A. Novel scaffold for bone regeneration compound of the hydroxyapatite, simvastatin and galactomanan. In: **XII Encontro da SBPMat, 2013.**

- CÂNDIDO, M. C. L.; CARVALHO, E.V.; COSTA, V. M.; NETO, D. M. A.; CHAVES, A. V.; SOUZA, N. D. G.; MARTINS, D. V.; CARDOSO, F. A. C. C.; FECHINE, P. B. A. Synthesis of octacalcium phosphate (OCP), dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) and inoculation of chitosan matrix for application in bone regeneration. . In: **XII Encontro da SBPMat, 2013**

- PAIVA, D. V. M.; CARVALHO, E. V.; COSTA, V. M.;SOUZA, N. D. G.; CÂNDIDO, M. C. L.; SOMBRA, A. S. B.; SILVA, M. A. S.; FECHINE, P. B. A. Dielectric and morphological characterization of the YIG- CTO composite. In: **XII Encontro da SBPMat, 2013.**

- COSTA, V. M.; CHAVES, A.V.; CARVALHO, E.V.; PAIVA, D. V.M.; CÂNDIDO, M. C. L.; SOUZA, N. D. G.; MALLMANN, E. J. J.; FECHINE, P. B. A. Photoluminescent nanocomposites obtained from Magnetite / APTES system. In. : **XII Encontro da SBPMat, 2013.**

- SOUZA, N. D. G.; MALLMANN, E. J. J.; FREIRE, R. M.; CARVALHO, E.V.; PAIVA, D. V.M.; CÂNDIDO, M. C. L.; COSTA, V. M.; FECHINE, P. B. A.

Galactomannan, glycerol and magnetic nanoparticles composites for biotechnological applications. In.: XII Encontro da SBPMat, 2013.

- CARVALHO, E.V.; MENDONÇA, G. L. F.; NETO, D. M. A.; COSTA, V. M.; MALLMANN, E. J. J.; NETO, P. L.; LONGHINOTTI, E.; FECHINE, P. B. A. Novel nanohydroxyapatite based material for drug controlled releasing. In. : XI Encontro da SBPMat, 2012.

- ANDRADE NETO, D. M. ; CARVALHO, E. V. ; FECHINE, P. B. A. . Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles Obtained by Hydrothermal Method. In. : XI Encontro da SBPMat, 2012.

- MALLMANN, E. J. J.; COSTA, V. M.; CARVALHO, E.V.; LOPES, L. G. F.; SOUSA, E. H. S; LONGHINOTTI, E.; GOMES, E. C. C; CARVALHO, I. M.; FECHINE, P. B. A. Novel magnetic nanocomposite to deliver nitric oxide on biological médium. In. : XI Encontro da SBPMat, 2012.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. F. L. *et al.* Optical and electrical properties of barium titanate-hydroxyapatite composite screen-printed thick films. **Solid State Sciences**, v. 6, n. 3, p. 267-278, 2004.
- ALTAVILLA, C.; CILIBERTO, E. Inorganic nanoparticles: synthesis, applications, and perspectives. **Taylor & Francis**, 2010. ISBN 9781439817629.
- ANBINDER, A. L.; QUIRINO, M. R. D. S.; ROCHA, R. F. D. Statins and bone tissue: a literature review. **Revista de Odontologia da Unesp**, v. 35, n. 4, p. 239-246, 2006.
- ARAÚJO, T. S. D. **Produção de hidroxiapatita pura e dopada para aplicação em biosensores**. 2006. Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão.
- ARENDS, J. *et al.* A calcium hydroxyapatite precipitated from an aqueous solution: an international multimethod analysis. **Journal Of Crystal Growth**, v. 84, n. 3, p. 515-532, 1987.
- BARAKAT, A. M. N. *et al.* Physiochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: extraction of biologically desirable HAp. **Materials Science And Engineering C**, v. 28, p. 1381–1387, 2008.
- BLEICHER, L.; SASAKI, J. M.; SANTOS, C. O. P. Development of graphical interface for the Rietveld refinement program DBWS. **Journal Of Applied Crystallography**, v. 33, p. 1189, 2000.
- BRANT, A. J. C. **Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de soluções e misturas de soluções de quitosana e poli(n-vinil-2-pirrolidona)**. 2008. 170 Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BRITO, G. F. *et al.* Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica De Materiais E Processos**, v. 6.2, p. 127-139, 2011.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309 - 319, 1938.
- CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: 2003.
- CASAGRANDE, S. P.; BLANCO, R. C. Método de Rietveld para el estudio de estructuras cristalinas. **Revista de La Facultad de Ciencias de La Uni - REVCIUNI**, v. 9, n. 1, 2005.
- CHEN, J. *et al.* A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders. **Materials Letters**, v. 65, n. 12, p. 1923-1926, 2011.
- COSTA, A. C. F. D. M. *et al.* Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica De Materiais E Processos**, v. 4, n. 3, 2009.
- COSTA, A. C. F. M. *et al.* Avaliação do tamanho da partícula do ZNO obtido pelo método Pechini. **Revista Eletrônica De Materiais E Processos**, v. 2.3, p. 14-19, 2007.

ESPANOL, M. *et al.* Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. **Acta Biomater**, v. 5, n. 7, p. 2752–2762, 2009.

FANCIO, E. **Aplicação do método de Rietveld para análise quantitativa de fases dos polimorfos da zircônia por difração de raios x.** 1999. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERRAZ, M. P. *et al.* Effect of chemical composition on hydrophobicity and zeta potential of plasma sprayed HA/CAO - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass coatings. **Biomaterials**, v. 22, p. 3105 - 3112, 2001.

FERREIRA, D. B. *et al.* Efeitos de bifosfonatos e estatinas na reparação de fraturas em tíbias de ratas com osteoporose induzida com dexametasona. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 29 n. 2, p. 203-209, 2008.

FIGUEIREDO, J. L.; RIBEIRO, F. R. **Catalise heterogenea.** Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1989. isbn 9789723100778.

FONTES, R. A. M. **Fabrico e caracterização de scaffolds à base defosfatos de cálcio.** 2010. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

FORD, J. L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical thermal analysis: techniques and applications.** Ellis Horwood, 1989. ISBN 9780745803463.

GINEBRA, M.P. *et al.* Calcium phosphate cements as drug delivery materials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 12, p. 1090-1110, 2012.

GONÇALVES, S. B. **Extração, purificação e estudos sobre a formação de filmes monomoleculares da hialuronidase bovina.** 2007. Universidade Federal do Rio de Janeiro

GRANDE, C. J. *et al.* Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 5, p. 1605-1615, 2009.

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, p. 1352-1358, 2010.

GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **European Cells and Materials**, n. 5, p. 1-16, 2003.

JANEGITZ, B. C. *et al.* Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, p. 879-884, 2007.

KNOWLES, J. C. *et al.* Structural changes of thermally sprayed hydroxyapatite investigated by rietveld analysis. **Biomaterials**, v. 17, n. 6, p. 639-645, 1996.

KONG, L. B.; MA, J.; BOEY, F. Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process. **Journal of Materials Science**, v. 37, n. 6, p. 1131-1134, 2002.

L. WANG, L. W., L. WANG, S. Song hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles with various counterions as templates **J. Ceram. Soc. Japan** n. 118, p. 1195-1198 2010

LEGEROS, R. Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. karger, 1991. ISBN 9783805552363.

LIU, H. S. et al. Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method. **Ceramics International**, v. 23, n. 1, p. 19-25, 1997.

LIU, X.; MA, P. X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 477-486, 2004.

LUO, Y. et al. docetaxel loaded oleic acid-coated hydroxyapatite nanoparticles enhance the docetaxel-induced apoptosis through activation of caspase-2 in androgen independent prostate cancer cells. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 2, p. 278-288, 2010.

MA, T.; XIA, Z.; LIAO, L. Effect of reaction systems and surfactant additives on the morphology evolution of hydroxyapatite nanorods obtained via a hydrothermal route. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 9, p. 4384-4388, 2011.

MALLMANN, E. J. J. **Obtenção de um novo compósito biológico com propriedades magnéticas**. 2010. Departamento De Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MAO, J. J. **Translational approaches in tissue engineering and regenerative medicine**. Artech House, Incorporated, 2008. ISBN 9781596931114.

MARKMAN, B. E. O.; ROSA, P. C. P. Avaliação de cápsulas manipuladas de sinvastatina por análise térmica (DSC) e CLAE-UV. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz Bial**, v. 21, n. 1, p. 9-11, 2011.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. 1999. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MOFFAT, A. C. *et al.* Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. **Pharmaceutical Press**, 2004. ISBN 9780853694731.

NASCIMENTO, W. J. **Preparação e caracterização físico-mecânica, microestrutural e térmica de compósitos a base de níbio e hidroxiapatita**. 2009. 23-24 Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

O'NEIL, M. J. **The merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. Wiley, 2006. ISBN 9780911910001.

OLIVEIRA, L. S. A. F. *et al.* Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, p. 37-44, 2010.

OLIVEIRA, M. A. D. *et al.* Análise térmica aplicada à caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 33, p. 1653-1657, 2010.

OLIVEIRA, M. A. D.; YOSHIDA, M. I.; LIMA GOMES, E. C. D. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, p. 1224-1230, 2011.

OLSSON, D. C. *et al.* Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2403-2412, 2008.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. **Biomaterials: principles and applications**. Taylor & Francis, 2002. isbn 9780849314919.

POLONINI, H. C. *et al.* Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do teor de simvastatina em cápsulas magistrais. **Química Nova**, v. 34, p. 516-519, 2011.

PONOMAREVA, N. *et al.* Microemulsion method for producing hydroxyapatite. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 80, n. 5, p. 905-908, 2010.

POSNER, A. S.; PERLOFF, A.; DIORIO, A. F. Refinement of the hydroxyapatite structure. **Acta Crystallographica**, v. 11, n. 4, p. 308-309, 1958.

PRAMANIK, S. *et al.* Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process. **Ceramics International**, v. 33, n. 3, p. 419-426, 2007.

RAMAKRISHNAN, V.; ARULDHAS, G. Vibrational spectra of cesium tellurate phosphate. **Infrared Physics**, v. 26, n. 6, p. 353-356, 1986.

RODRIGUES, P. O. *et al.* Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.

ROJBANI, H. *et al.* Evaluation of the osteoconductivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 98a, n. 4, p. 488-498, 2011.

ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; VAN NOORT, R. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, p. 273-277, 2000.

ROSSI, A. M. *et al.* A ciência e tecnologia das biocerâmicas. **revista do CBPF**, disponível em: < <http://portal.cbpf.br/protected/pages/divulgacao/pdfs/biomat.pdf> >. acesso em: 16/08/2012.

SAEED ARAYNE, M. *et al.* *In vitro* evidences for simvastatin and losartan potassium interaction and its in vivo implications. **Journal of The Chilean Chemical Society**, v. 54, p. 432-436, 2009.

SANTOS, M. L. *et al.* Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**, v. 30, p. 29-35, 2005.

SCOTT, R. A.; ELBERT, D. L.; WILLITS, R. K. Modular poly(ethylene glycol) scaffolds provide the ability to decouple the effects of stiffness and protein concentration on PC12 cells. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 3841–3849, 2011.

SILVA, C. C. D. **Estudo das propriedades óticas, elétricas e térmicas da hidroxiapatita obtida por moagem de alta energia, seus compósitos e filmes espessos**. 2003. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILVA JUNIOR, P. E.; ORÉFICE, R. L. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli(metacrilato de metila). **Polímeros**, v. 11, p. 109-115, 2001.

SILVA, M. H. P. D. **Apostila de Biomateriais 2000**.

SILVA, O. G. D. **Síntese e caracterização de híbridos inorgânicos-orgânico formados a partir de reações de silanização da hidroxiapatita e monetita** 2006. Universidade Federal da Paraíba

SMITH, W. F. **Princípios de ciência e engenharia dos materiais**. 3. Lisboa: 1998.

SÖDERLIND, F. *et al.* Synthesis and characterisation of Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocrystals functionalised by organic acids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 140–148, 2005.

SUZUKI, T. *et al.* Time-dependent variation of the surface structure of bioceramics in tissue culture medium and the effect on adhesiveness of cells. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 226-232, 1996.

SUZUKI, T. *et al.* Surface instability of calcium phosphate ceramics in tissue culture medium and the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent animal cells. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 34, n. 0021-9304, p. 507-517, 1997.

TANDALE, P.; JOSHI, D.; GAUD, R. S. Formulation and evaluation of extended release solid dispersions containing simvastatin. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 3, p. 13-19, 2011.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, p. 808-818, 2001.

TOYAMA, T.; NAKASHIMA, K.; YASUE, T. Hydrothermal synthesis of  $\beta$ -tricalcium phosphate from amorphous calcium phosphate. **Journal of The Ceramic Society of Japan** v. 110, n. 1284, p. 716-721, 2002.

V. V. C. AZEVEDO, S. A. C., D. C. BEZERRA, M. V. LIA FOOK, A. C. F. M.COSTA. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica De Materiais E Processos**, v. 2.3, p. 27-34, 2007.

VALERETO, I. D. C. L. **Caracterização de implantes dentais da liga ti-6ai-7nb revestidos por hidroxiapatita pela técnica plasma-spray**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares., 1998.

WANG, L. *et al.* Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles with various counterions as templates. **Journal of The Ceramic Society of Japan**, v. 118, n. 1384, p. 1195-1198, 2010 2010.

YANG, L.-X. *et al.* Hydrothermal synthesis of hierarchical hydroxyapatite: preparation, growth mechanism and drug release property. **Ceramics International**, v. 38, n. 1, p. 495-502, 2012.

YIN, A. *et al.* Physical parameters of hydroxyapatite adsorption and effect on candidacidal activity of histatins. **Archives of Oral Biology**, v. 48, n. 5, p. 361-368, 2003.

ZHANG, C. *et al.* Hydroxyapatite nano- and microcrystals with multiform morphologies: controllable synthesis and luminescence properties. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 6, p. 2725-2733, 2009/06/03 2009.

ZHAO, Q. *et al.* Template-directed hydrothermal synthesis of hydroxyapatite as a drug delivery system for the poorly water-soluble drug carvedilol. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 23, p. 10126-10133, 2011.

ZHOU, H.; LEE, J. **Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering**. 2011. ISBN 1878-7568.

ZHU, R. *et al.* Morphology control of hydroxyapatite through hydrothermal process. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 457, n. 1-2, p. 555-559, 2008.