

LUÍSA BARRELLA AMBROSIO

**$\beta$ -TCP MODIFICADO COM PLURONIC® PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE AGENTES APLICADOS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM TRATAMENTO DE OSTEOPOROSE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Araraquara  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

A496b	<p>Ambrosio, Luísa Barrella β-TCP modificado com pluronic® para liberação controlada de agentes aplicados na regeneração óssea em tratamento de osteoporose / Luísa Barrella Ambrosio. – Araraquara : [s.n], 2019 97 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques</p> <p>1. Osteoporose. 2. Regeneração óssea. 3. Tecnologia de liberação controlada. 4. Materiais compostos. 5. Osteogênese. I. Título.</p>
-------	--

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Beta-TCP modificado com pluronic® para liberação controlada de agentes aplicados na regeneração óssea em tratamento de osteoporose"

**AUTORA: LUISA BARRELLA AMBROSIO**

**ORIENTADOR: RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES**

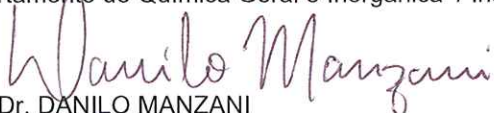
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES  
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA  
Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. DANILO MANZANI  
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 05 de julho de 2019

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO:

Nome: Luísa Barrella Ambrosio

Nome em citações bibliográficas: AMBROSIO, L. B.

ENDEREÇO PROFISSIONAL: Rua Prof. Francisco Degni, 55, Quitandinha, 1480-060, Araraquara-SP

### FORMAÇÃO ACADÊMICA:

#### **2016 – 2019 - Mestrado em Química**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

#### **2010 – 2016 - Graduação em Química Tecnológica Bacharelado**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Com período sanduíche em Claflin University (Programa Ciências Sem Fronteiras – CNPq)

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

### PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

Apresentação de projeto no **Entrepreneurship Workshop for Scientists and Engineer**, 2016 (Oficina).

**International Meeting on Bone and Biomaterials**, 2017 (Simpósio).

Apresentação de Poster no **5º Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais (5º OBI)**, 2017 (Congresso). Funcionalização de Micelas de MPEG-co-PCL com Ácido Fólico para Liberação Controlada de Metotrexato.

Participação de **65th Southeastern Regional Meeting of the American Chemical Society (SERMACS)**, 2013 (Congresso).

Apresentação de Poster no **XI Brazilian MRS Meeting**, 2012 (Congresso). Preparation of polythiophene/silica hybrid films with excellent miscibility.

Participação na XLI Semana da Química, 2011 (Curso: Química Cosmética).

Participação na XL Semana da Química, 2010 (Curso: Compostos químicos dos alimentos).

## AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para com ele.

Aos meus pais, Beatriz e Roberto, e minha irmã, Marcella por todo apoio, amor, incentivo e confiança durante toda minha trajetória.

Ao Marcelo, obrigada por todo incentivo e por me acompanhar em todos os momentos.

À todos os meus amigos de todos os locais, obrigada pelo incentivo, todos os momentos de diversão e por tornarem meus dias mais leves e felizes.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides, muito obrigada por toda colaboração, discussões e conhecimentos trocados. De forma especial, gostaria de agradecer à Carol, Gabriel, Gibbs, Pelé e Chico, por toda ajuda durante a realização desse trabalho, e pelos momentos de diversão em Araraquara.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo F. C. Marques, Jataí, muito obrigada pela recepção no grupo e pela confiança. Gostaria de agradecer todo conhecimento compartilhado, sua orientação e conselhos nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior, obrigada pela contribuição e todo ensinamento.

À CAPES, pela bolsa concedida.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Química.

*“Que nada nos limite. Que nada nos defina.*

*Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância.”*

Simone de Beauvoir

## RESUMO

A osteoporose é uma doença do tecido ósseo causada pela desregulação hormonal, que atinge uma grande parcela da população, principalmente mulheres pós-menopausa. Uma das principais consequências da osteoporose são fraturas, que ocorrem devido a diminuição da densidade óssea causada pela doença. Atualmente, busca-se uma maior eficácia em tratamentos, unificando a engenharia de tecidos e a liberação controlada de fármacos, em um sistema de *drug delivery*. Os compósitos são uma alternativa aos tratamentos atuais por unir em um só material as propriedades das cerâmicas e dos polímeros biodegradáveis, apresentando melhores características físicas, de biodegradabilidade e biocompatibilidade. A utilização de compósitos biocompatíveis e biodegradáveis na entrega de agentes osteogênicos, como fármacos, íons, proteínas ou sinalizadores celulares, tem se apresentado eficiente para utilização no tratamento de fraturas ósseas, com resultados positivos de osteoindução, osteointegração e reabsorção por parte do tecido, indicando o favorecimento da regeneração óssea. Desta maneira, a proposta deste trabalho foi o preparo de materiais compósitos cerâmico-polimérico para suporte de liberação controlada de agentes osteogênicos. Foram preparados compósitos de fosfato de cálcio na fase  $\beta$  e de copolímero Pluronic<sup>®</sup>, no qual incorporou-se íons cobalto, os fármacos alendronato ou o ranelato de estrôncio, para o estudo da liberação controlada destes agentes, visando o uso como enxerto ósseo no tratamento de osteoporose. Os agentes foram incorporados pelo método de dispersão sólida, e os materiais compósitos e a matriz polimérica foram caracterizados por difratometria de raios X, espectroscopia na região do infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de varredura, possibilitando a identificação da composição e morfologia dos materiais. Os estudos de liberação foram realizados com êxito, aplicados na definição da melhor matriz polimérica para a liberação proposta, e a comparação e avaliação dos perfis de liberação de cada um dos agentes foi realizada. Os perfis de liberação dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2, se mostraram adequados para a aplicação proposta, uma vez que as liberações ocorreram continuamente durante uma semana, período importante do processo da regeneração óssea.

**Palavras chave:** Osteoporose, Regeneração Óssea, Liberação controlada,  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup>, Cobalto, Alendronato, Ranelato de Estrôncio.

## ABSTRACT

Osteoporosis is a bone tissue disease caused by hormonal dysregulation, which affects a large portion of the population, especially postmenopausal women. Fractures are one of the main osteoporosis consequences, which occurs due the bone density decrease caused by the disease. Nowadays, more efficiently treatments are searched, combining tissue engineering and controlled drug release in a drug delivery system. Composite materials are an alternative in current treatment for finding in one single material the properties of ceramics and biodegradable polymers, presenting better physical characteristics, as biodegradability and biocompatibility. Biocompatible and biodegradable composite uses in the delivery of osteogenic agents, such as pharmaceuticals, ions, proteins or cell signaling, has been shown to be efficient in bone fracture treatment, with positive results of osteoinduction, osteointegration and tissue resorption, indicating the bone regeneration. In this way, this work proposed to prepare ceramic-polymer composite for support the osteogenic agents controlled delivery. It was prepared composites of calcium phosphate and copolymer Pluronic<sup>®</sup>, in which cobalt ions or the drugs alendronate or strontium ranelate were incorporated, for study the agents controlled release, aiming the uses as bone scaffold in osteoporosis treatment. The agents were incorporated by solid dispersion method, and the composites and polymer matrix were characterized by X-ray diffractometry, infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis and scanning electron microscopy, enabling composition and morphology identification of the material. The drug delivery studies were successfully performed, defining the best polymer for the proposed release, by comparison and evaluation of the agents release profiles. The release profiles of the composites  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalt,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronate-1,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronate-2 and  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelate-2, were shown to be appropriated in the proposed application, since the release occurred continuously during one week, an important period of the bone regeneration process.

**Keywords:** Osteoporosis, Bone Regeneration, Drug Delivery,  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup>, Cobalt, Alendronate, Strontium Ranelate.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Tomografia computadorizada apresentando a acentuada diminuição do tecido ósseo no osso com osteoporose quando comparado ao osso normal. ....	16
<b>Figura 2</b> – Modelo do mecanismo de ativação de osteoclastos e osteoblastos para a reabsorção e formação de tecido ósseo. ....	17
<b>Figura 3</b> – Processo natural de regeneração óssea, desde o processo inflamatório até a remodelação óssea, indicando quais células são responsáveis por cada etapa da regeneração. ....	19
<b>Figura 4</b> – Estrutura molecular de fármacos da classe bisfosfonatos. A família de fármacos é gerada com a substituição de diferentes grupos funcionais nas posições R <sup>1</sup> e R <sup>2</sup> . ....	21
<b>Figura 5</b> – Representação da estrutura do Pluronic <sup>®</sup> . As letras X e Y representam o número de unidades de óxido de etileno e óxido de propileno na cadeia do copolímero, respectivamente. ....	25
<b>Figura 6</b> – Representação da mimetização de hipóxia por íons cobalto. Mecanismo de ativação da angiogênese. ....	26
<b>Figura 7</b> – Estrutura química do alendronato trihidratado. ....	27
<b>Figura 8</b> – Estrutura química do alendronato trihidratado. ....	28
<b>Figura 9</b> – Estrutura química do ranelato de estrôncio. ....	28
<b>Figura 10</b> – Mecanismos de ação do ranelato de estrôncio em células do tecido ósseo. ....	29
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática do método de liberação. ....	36
<b>Figura 12</b> – Estrutura do complexo Tiocianato de Cobalto. ....	36
<b>Figura 13</b> – Possível mecanismo de reação do alendronato com ninidrinha. ....	38
<b>Figura 14</b> – Difratoograma de raios X do grão $\beta$ -TCP e do padrão de difração de raios X do $\beta$ -TCP (JCPDS 70-2065). ....	42
<b>Figura 15</b> – Difratoograma de raios X das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108 e Composito $\beta$ -TCP-Pluronic. ....	42
<b>Figura 16</b> – Espectro na região do infravermelho das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108 e Composito $\beta$ -TCP-Pluronic. ....	43
<b>Figura 17</b> – Curvas de DSC das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108 e Composito $\beta$ -TCP-Pluronic. ....	45
<b>Figura 18</b> – Curvas de TG das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108 e Composito $\beta$ -TCP-Pluronic. ....	46

<b>Figura 19</b> – Curvas de TG-DTG das amostras (a) Pluronic® F108 e (b) Composito $\beta$ -TCP-Pluronic.....	47
<b>Figura 20</b> – Micrografias eletrônicas das amostras (a), (b) e (c) grão $\beta$ -TCP e (d), (e) e (f) Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic. ....	48
<b>Figura 21</b> – Espectro na região do infravermelho das amostras Pluronic® L121, Pluronic® P123 e Pluronic® F108.....	49
<b>Figura 22</b> – Curva de calibração para determinação de íons cobalto. ....	50
<b>Figura 23</b> – Curva de liberação de íons cobalto das amostras F108Co, P123Co e L121Co...52	
<b>Figura 24</b> – Difratoograma de raios X de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e do padrão de difração de raios X de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (JCPDS 29-466).....	54
<b>Figura 25</b> – Difratoograma de raios X das amostras $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic® F108 e F108Co. 54	
<b>Figura 26</b> – Curvas de DSC das amostras $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic® F108 e F108Co.....	55
<b>Figura 27</b> – Curvas de DSC das amostras $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic® F108 e F108Co na faixa de -50mW a 30mW. ....	56
<b>Figura 28</b> – Micrografias eletrônicas de alta resolução da amostra (a), (b) e (c) F108Co. ....	57
<b>Figura 29</b> – Difratoograma de raios X das amostras de grão $\beta$ -TCP, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic® F108 e $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto.....	58
<b>Figura 30</b> – Curvas de DSC das amostras de grão $\beta$ -TCP, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic® F108 e $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto na faixa de -50mW a 30mW.....	59
<b>Figura 31</b> – Curvas de TG das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic® F108, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e Composito $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto. ....	60
<b>Figura 32</b> – Curvas de TG-DTG das amostras (a) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e (b) Composito $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto.....	61
<b>Figura 33</b> – Micrografias eletrônicas de alta resolução da amostra (a), (b), (c) e (d) $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto.....	62
<b>Figura 34</b> – Difratoograma de raios X das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic® F108 e $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2. ....	63
<b>Figura 35</b> – Espectro na região do infravermelho das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic® F108, Alendronato, Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2. ....	64
<b>Figura 36</b> – Curvas de DSC das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic® F108, Alendronato e Composito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1. ....	66
<b>Figura 37</b> – Curvas de DSC das amostras de $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 na faixa de -3 mW a -8 mW. ....	67

<b>Figura 38</b> – Curvas de TG das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108, Alendronato, Composito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2.....	68
<b>Figura 39</b> – Curvas de TG-DTG das amostras (a) alendronato, (b) Composito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e (c) Composito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2.....	69
<b>Figura 40</b> – Micrografias eletrônicas de alta resolução da amostra (a), (b), (c) $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1.....	70
<b>Figura 41</b> – Difratoograma de raios X das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108 e $\beta$ -TCP-Ranelato-1 e $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2. ....	71
<b>Figura 42</b> – Espectro na região do infravermelho das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108, Ranelato de Estrôncio, Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2.....	73
<b>Figura 43</b> – Curvas de DSC das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108, ranelato de estrôncio, compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2. ....	74
<b>Figura 44</b> – Curvas de DSC das amostras de $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108, ranelato de estrôncio, compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 na faixa de -3 mW a -8 mW. ....	75
<b>Figura 45</b> – Curvas de TG das amostras de grão $\beta$ -TCP, Pluronic <sup>®</sup> F108, Ranelato de Estrôncio, $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e Composito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2.....	76
<b>Figura 46</b> – Curvas de TG-DTG das amostras (a) alendronato, (b) Composito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e (c) Composito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2. ....	77
<b>Figura 47</b> – Micrografias eletrônicas de alta resolução da amostra (a), (b) e (c) $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1.....	78
<b>Figura 48</b> – Curva de liberação de íons cobalto das amostras F108Co e $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto. ....	79
<b>Figura 49</b> – Curva de calibração para determinação de alendronato.....	81
<b>Figura 50</b> – Curva de liberação de alendronato das amostras $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2.....	82
<b>Figura 51</b> – Curva de calibração para determinação de ranelato de estrôncio. ....	83
<b>Figura 52</b> – Curva de liberação de ranelato de estrôncio das amostras $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2. ....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Propriedades das cerâmicas de fosfato de cálcio importantes para regeneração óssea. .....	23
<b>Tabela 2</b> – Característica de Pluronic <sup>®</sup> . Número de unidades dos polímeros PEO e PPO, massa molar e valor de HLB para cada bloco .....	25
<b>Tabela 3</b> – Reagentes e solventes utilizados.....	33
<b>Tabela 4</b> – Razão de polímero Pluronic <sup>®</sup> F-108 e grão de $\beta$ -TCP utilizado para preparar amostras de compósito. ....	34
<b>Tabela 5</b> – Características de diferentes copolímeros Pluronic <sup>®</sup> : número de unidades dos polímeros PEO e PPO, massa molar e valor de HLB.....	34
<b>Tabela 6</b> – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.....	44
<b>Tabela 7</b> – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.....	50
<b>Tabela 8</b> – Reação proposta para a desidratação de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e perdas de massas calculadas. .....	61
<b>Tabela 9</b> – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.....	65
<b>Tabela 10</b> – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.....	73
<b>Tabela 11</b> – Valores obtidos a partir de ajuste linear das curvas de liberação seguindo modelos cinéticos de Korsmeyer-Peppas e de Primeira Ordem. ....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BMP - Proteína morfogenética óssea
- $\beta$ -TCP - Fosfato tricálcico na fase beta
- CaSR - Receptor sensível ao cálcio
- DSC - Calorimetria exploratória diferencial
- DRX - Difractometria de raios X
- FGF - Fator de crescimento fibroblástico
- FPPS - Enzima farnesil pirofosfato
- FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho
- GGPP - Proteínas geranylgeraniladas
- HA - Hidroxiapatita
- HIF-1 $\alpha$  - Fatores de indução de hipóxia-1a
- HLB - Balanço hidrofílico-lipofílico
- MEV - Microscopia eletrônica de varredura
- OPG - Osteoprotegerina
- PBS - Tampão Fosfato Salino
- PCL - Policaprolactona
- PEG - Polietilenoglicol
- PEO - Poli(óxido de etileno)
- PGA - Ácido poliglicólico
- PGE<sub>2</sub> - Prostaglandina E<sub>2</sub>
- PLA - Ácido poli-L-láctico
- PLGA - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
- PPO - Poli(óxido de propileno)
- RANK - Receptor ativador do fator Kappa B
- RANKL - Ligante do receptor ativador do fator kappa B RANKL
- TCP - Fosfato tricálcico
- TGA - Análise termogravimétrica
- THF - Tetraidrofurano
- UV-Vis - Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	16
<b>1.1. Osteoporose</b> .....	16
<b>1.2. Fratura óssea</b> .....	17
<b>1.3. Tratamentos</b> .....	19
<b>1.4. Engenharia de tecido</b> .....	21
<b>1.4.1. Cerâmica de fosfato de cálcio</b> .....	22
<b>1.4.2. Polímeros</b> .....	24
<b>1.4.3. Cobalto</b> .....	26
<b>1.4.4. Alendronato</b> .....	27
<b>1.4.5. Ranelato de Estrôncio</b> .....	28
<b>1.5. Drug delivery</b> .....	30
<b>2. Objetivos</b> .....	32
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	33
<b>3.1. Reagentes e Materiais</b> .....	33
<b>3.2. Preparo do Compósito <math>\beta</math>-TCP-Pluronic</b> .....	33
<b>3.3. Incorporação de Íons Cobalto na Matriz Polimérica</b> .....	34
<b>3.4. Preparo do Compósito <math>\beta</math>-TCP-Pluronic-Cobalto</b> .....	34
<b>3.5. Preparo do Compósito <math>\beta</math>-TCP-Pluronic-Alendronato e <math>\beta</math>-TCP-Pluronic-Ranelato..</b> .....	35
<b>3.6. Estudos de Liberação</b> .....	35
<b>3.6.1. Determinação de Íons Cobalto (<math>\text{Co}^{2+}</math>)</b> .....	36
<b>3.6.1.1. Curva de Calibração para Quantificação de Íons Cobalto</b> .....	37
<b>3.6.2. Determinação de Alendronato</b> .....	37
<b>3.6.2.1. Curva de Calibração para Quantificação de Alendronato</b> .....	38
<b>3.6.3. Determinação de Ranelato de Estrôncio</b> .....	38
<b>3.6.3.1. Curva de Calibração para Quantificação de Ranelato de Estrôncio</b> .....	38

<b>3.7. Técnicas Caracterização</b> .....	39
<b>3.7.1. Difractometria de Raios X (DRX)</b> .....	39
<b>3.7.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)</b> .....	39
<b>3.7.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b> .....	39
<b>3.7.4. Análise Termogravimétrica (TGA)</b> .....	39
<b>3.7.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	40
<b>3.7.6. Espectroscopia na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)</b> .....	40
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	41
<b>4.1. Compósito <math>\beta</math>-TCP-Pluronic</b> .....	41
<b>4.1.1. Caracterização Compósito <math>\beta</math>-TCP-Pluronic</b> .....	41
<b>4.1.1.1. Difractometria de Raios X (DRX)</b> .....	41
<b>4.1.1.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)</b> .....	43
<b>4.1.1.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b> .....	44
<b>4.1.1.4. Análise Termogravimétrica (TGA)</b> .....	46
<b>4.1.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	47
<b>4.2. Determinação da Matriz Polimérica</b> .....	48
<b>4.2.1. Caracterização da Matriz Polimérica</b> .....	49
<b>4.2.1.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)</b> .....	49
<b>4.2.2. Curvas de Liberação de íons Cobalto da Matriz Polimérica</b> .....	50
<b>4.2.2.1. Curva de Calibração</b> .....	50
<b>4.2.2.2. Curva de Liberação de Íons Cobalto da Matriz Polimérica</b> .....	51
<b>4.2.3. Caracterização da Matriz Polimérica com Íons Cobalto Incorporados</b> .....	53
<b>4.2.3.1. Difractometria de Raios X (DRX)</b> .....	53
<b>4.2.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b> .....	55
<b>4.2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	56
<b>4.3. Caracterização do Compósito <math>\beta</math>-TCP-Pluronic-Cobalto</b> .....	57
<b>4.3.1. Difractometria de Raios X (DRX)</b> .....	57

4.3.2.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	58
4.3.3.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	59
4.3.4.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	61
4.4.	Caracterização do Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato .....	62
4.4.1.	Difratometria de Raios X (DRX).....	63
4.4.2.	Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) .....	64
4.4.3.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	66
4.4.4.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	68
4.4.5.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	69
4.5.	Caracterização do Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato .....	70
4.5.1.	Difratometria de Raios X (DRX).....	71
4.5.2.	Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) .....	72
4.5.3.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	74
4.5.4.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	76
4.5.5.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	77
4.6.	Estudos de Liberação .....	78
4.6.1.	Curva de Liberação de Íons Cobalto .....	79
4.6.2.	Curva de Liberação de Alendronato.....	80
4.6.3.	Curva de Liberação de Ranelato de Estrôncio .....	83
4.6.4.	Análise Cinética.....	85
5.	Conclusões.....	88
6.	Perspectivas.....	88
7.	Referência .....	89



## 1. Introdução

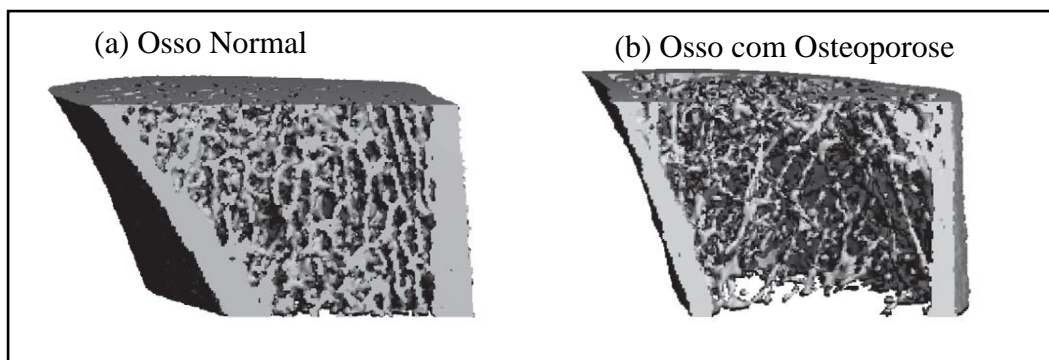
### 1.1. Osteoporose

A osteoporose é uma doença do esqueleto causada pela fragilidade óssea e diminuição da densidade óssea, tornando-o suscetível a fraturas. Esta doença apresenta uma maior prevalência em mulheres brancas, acima de 50 anos, em geral pós-menopausa. Nesse caso, é consequência de um déficit de hormônio estrógeno, que em quantidades normais é responsável por regular a dinâmica de formação e reabsorção óssea <sup>1,2</sup>.

Além de fatores hormonais, pode-se citar outros fatores de risco para osteoporose e consequente fraturas, como: falha prematura nos ovários, baixo peso corporal, histórico familiar, fratura ou trauma ósseo prévio, artrite reumatoide, tabagismo, alcoolismo, baixa densidade mineral óssea, deficiência de vitamina D, baixa ingestão de cálcio, hipercifose, quedas ou imobilizações ósseas incorretas <sup>2-5</sup>.

É apresentado na Figura 1 uma tomografia de um osso normal (a) e um osso com osteoporose (b). É possível verificar a grande diferença na densidade óssea e o aumento da porosidade, quando comparado um osso com osteoporose e um osso normal.

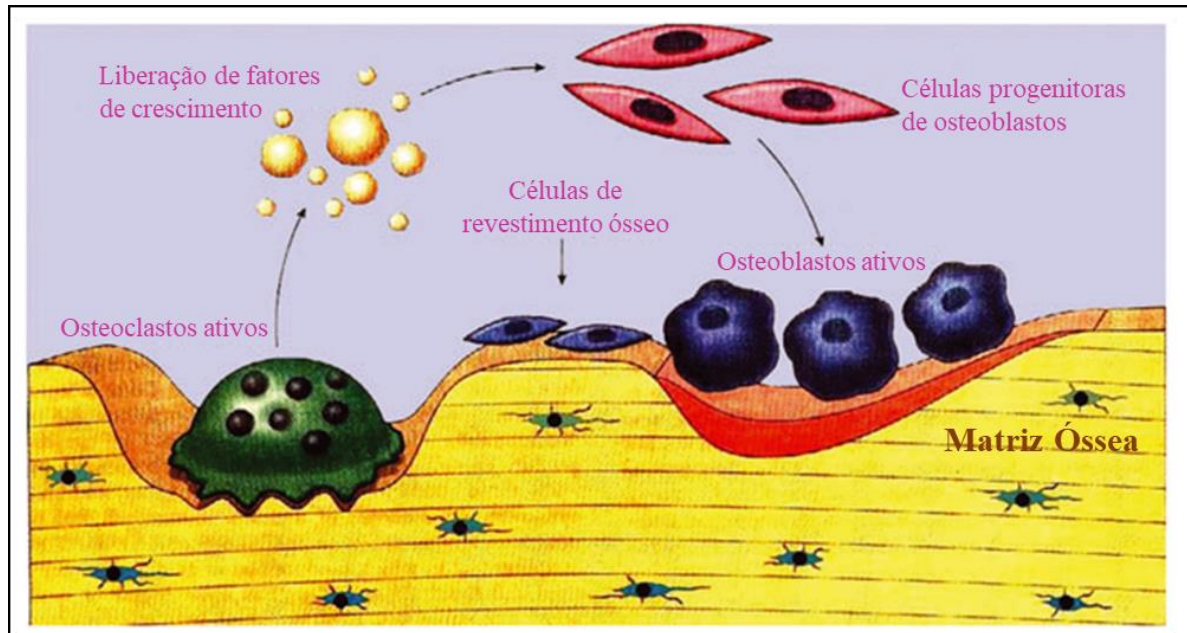
**Figura 1** – Tomografia computadorizada apresentando a acentuada diminuição do tecido ósseo no osso com osteoporose quando comparado ao osso normal.



**Fonte:** Adaptado de RACHNER; KHOSLA; HOFBAUER (2011, p.1276) <sup>6</sup>.

O osso está em um processo constante de formação e reabsorção, na qual o tecido ósseo antigo é substituído por um novo depósito ósseo. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, enquanto os osteoblastos pela formação <sup>7</sup>. Este mecanismo baseia-se na seguinte sequência: ativação dos osteoclastos, seguida pela reabsorção óssea e liberação de fatores que ativam ou promovam a diferenciação de osteoblastos, e finalmente a ação dos osteoblastos para formação do osso <sup>8,9</sup>. É ilustrado na Figura 2 o processo de reabsorção e formação óssea e a ação de osteoblastos e osteoclastos.

**Figura 2** – Modelo do mecanismo de ativação de osteoclastos e osteoblastos para a reabsorção e formação de tecido ósseo.



**Fonte:** Adaptado de BIGHAM-SADEGH; ORYAN, (2015, p. 3) <sup>10</sup>.

A formação e atividade de cada uma das células do tecido ósseo dependem de níveis hormonais basais de cada pessoa, os quais alteram-se com o envelhecimento e principalmente em mulheres pós-menopausa. A alteração hormonal, principalmente do estrogênio, é uma das causas da osteoporose, pois ocorre a redução na quantidade de células do tipo osteoblastos presentes no tecido ósseo. Também afeta, as células do tipo osteoclastos, uma vez que este hormônio é regulador da formação de osteoclastos, logo é um fator direto para o desequilíbrio celular no tecido ósseo. Este desequilíbrio nas células que compõe o tecido ósseo, tem como consequência a atrofia óssea e dificuldade de recuperação de fraturas ósseas <sup>7</sup>.

Portanto, como efeitos da doença há o aumento do risco de fratura óssea, além de afetar a habilidade do tecido ósseo em reparar fraturas devido a fragilidade óssea e desregulação celular. As fraturas osteoporóticas tendem a acontecer principalmente em pessoas que já sofreram fraturas prévias e em idosos <sup>1,2,7</sup>.

A doença pode ser diagnosticada previamente por meio de exames de medição de densidade óssea. Porém, em muitos casos, por ser uma doença assintomática no início, o diagnóstico de osteoporose só ocorre tardiamente, após a primeira fratura <sup>5,6,11</sup>.

## 1.2. Fratura óssea

O tecido ósseo apresenta uma notável habilidade de regeneração após sofrer agressões, falhas ou fraturas, devido a sua complexa composição celular. Diferentemente dos outros

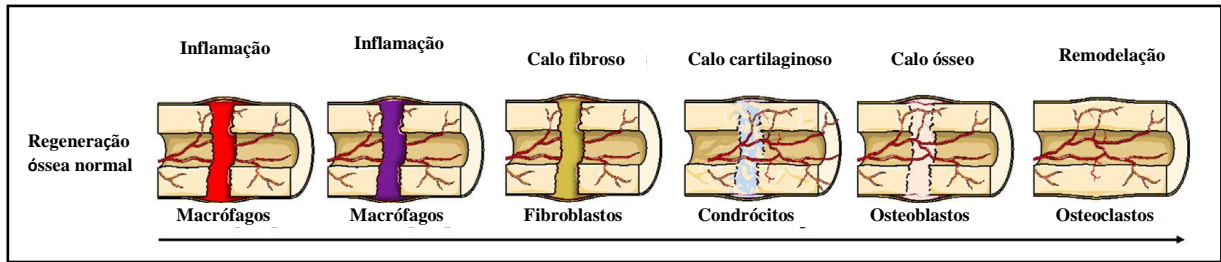
tecidos, que respondem a agressões por meio da cicatrização, o tecido ósseo é capaz de retornar ao seu aspecto original. Esse reparo do tecido depende de um processo inflamatório, não somente de osteoblastos e osteoclastos e constitui-se das seguintes etapas: inflamação, formação do calo ósseo e remodelamento ósseo <sup>12,13</sup>.

A inflamação é iniciada com formação de um hematoma na extremidade da fratura, que servirá de matriz provisória para células inflamatórias que serão, por sua vez, atraídas pela presença das plaquetas, matriz extracelular lesada e sinais liberados por células necrosadas. As primeiras células inflamatórias que migram para o local da fratura são neutrófilos e macrófagos, responsáveis pela remoção da matriz extracelular lesada e células necrosadas por meio de fagocitose. Neutrófilos e macrófagos, a partir da liberação de citocinas e fatores de crescimento, recrutam fibroblastos e condrócitos, responsáveis pela produção de tecido conjuntivo colagenizado (calo fibroso) e cartilagem (calo cartilaginosa), respectivamente, assim como células-tronco mesenquimais que se diferenciarão em células responsáveis pela regeneração óssea <sup>13-15</sup>.

O calo ósseo mole (calo cartilaginosa) é, inicialmente, formado em um ambiente com baixa oxigenação devido ao rompimento de grande número de vasos sanguíneos no local da fratura. Este ambiente com pouco oxigênio, juntamente com sinais liberados por macrófagos, guiarão a diferenciação de células-tronco mesenquimais em condrócitos. Assim, há a formação do calo ósseo mole, constituído predominantemente de cartilagem hialina, que promove suporte mecânico para o processo de reparo <sup>13-15</sup>.

Nas extremidades do calo ósseo mole, há áreas com melhor irrigação sanguínea, que permitem a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos que iniciarão a formação de tecido ósseo, representando o primeiro estágio de mineralização do esqueleto fibrocartilaginosa. Há substituição progressiva do tecido cartilaginosa por trabéculas ósseas e formação do calo ósseo duro. A formação do calo ósseo duro promove maior estabilidade para que o osso possa retornar às suas funções normais. Após algumas semanas ou meses da fratura, se inicia o processo de remodelamento ósseo caracterizado pela remoção do tecido ósseo imaturo e matriz cartilaginosa por osteoclastos, e estabelecimento da estrutura óssea típica no local onde ocorreu a fratura <sup>13,14</sup>. É ilustrado na Figura 3 o mecanismo de regeneração da fratura óssea, desde o processo inflamatório até a remodelação óssea, indicando quais as células responsáveis por cada etapa da regeneração.

**Figura 3** – Processo natural de regeneração óssea, desde o processo inflamatório até a remodelação óssea, indicando quais células são responsáveis por cada etapa da regeneração.



Fonte: Adaptado de LOI et al., (2016, p. 127) <sup>13</sup>.

Cada uma das complexas interações celulares responsáveis pela regeneração óssea são cruciais para que a cicatrização efetiva da fratura ocorra. No caso de uma fratura em um osso com osteoporose, fatores da doença como fragilidade óssea, baixa densidade óssea, alta porosidade óssea e desregulação das células responsáveis pela regeneração óssea, podem afetar negativamente este processo de cicatrização <sup>5,11</sup>.

As maiores ocorrências de fraturas osteoporóticas são na coluna vertebral, quadril e punhos, podendo ocorrer também no fêmur, úmero e costelas. Casos mais graves de fratura, no quadril e na coluna vertebral, apresentam alto custo no tratamento e grande dificuldade de cicatrização da fratura <sup>5,6</sup>.

Fraturas consequentes da osteoporose se tornaram casos de saúde pública, uma vez que a cada ano aumentam o número de fraturas e o número de fraturas não cicatrizadas <sup>12</sup>. As fraturas, além de causarem problemas de mobilidade e autonomia aos pacientes, podem levar a complicações de saúde devido a hospitalização dos mesmos, como o risco de desenvolver pneumonia ou trombose, aumentando os casos de mortalidade relacionados à osteoporose <sup>6</sup>.

### 1.3. Tratamentos

Apesar do grande potencial de regeneração do tecido ósseo, a cicatrização de fraturas pode falhar dependendo de diversas condições, como no caso das fraturas causadas pela osteoporose. Estas apresentam características que impedem a regeneração normal do tecido ósseo: a dificuldade de recuperação e a fragilidade do tecido ósseo em torno da fratura <sup>13,16</sup>.

Atualmente, próteses ortopédicas são usadas para substituir ou reparar os danos causados no osso. Tais implantes apresentam problemas como alto custo, transmissão de doenças infecciosas, rejeição imunológica, infecções, falha na fixação, necessidade de substituição do implante no caso de materiais metálicos e até casos em que se realizam duas cirurgias quando o implante é feito utilizando o osso de outra região do corpo do próprio

paciente<sup>17-20</sup>. A engenharia de tecido auxilia a regeneração de tecido ósseo no tratamento de pacientes com osteoporose, utilizando implantes e enxertos na localidade da fratura suprimindo ou substituindo o osso, como possível alternativa para as próteses ortopédicas<sup>3</sup>.

O sucesso na recuperação de uma fratura não depende somente de estabilidade mecânica e a proximidades das extremidades da fratura, mas também de presença de células-tronco mesenquimais, células osteoprogenitoras e células do sistema imunológico para regular o processo de cicatrização da fratura<sup>13</sup>. A engenharia de tecidos também pode auxiliar nesta recuperação, incorporando a implantes ou enxertos células, proteínas sinalizadoras, fatores de crescimento, enzimas, biomoléculas ativas, íons inorgânicos ou até mesmo fármacos, que podem auxiliar acelerando e intensificando o processo de regeneração óssea<sup>21,22</sup>.

Exemplos de possíveis aplicações da engenharia de tecidos na regeneração óssea são apresentadas em estudos nos últimos anos. Como, por exemplo, a proposta de utilização de compósitos biocompatíveis com proteína osteoindutora morfogenética óssea (BMP) incorporadas, combinados ou não com osteoblastos, que acelera a mineralização óssea e crescimento ósseo no local da fratura, podendo manter a expressão da osteogênese<sup>21,22</sup>. Outra alternativa é a utilização de fator de crescimento fibroblástico (FGF), sinalizador responsável por iniciar a osteogênese induzindo a diferenciação de osteoblastos, para auxiliar na cicatrização da fratura ou na fixação de implantes ortopédicos<sup>19,23,24</sup>.

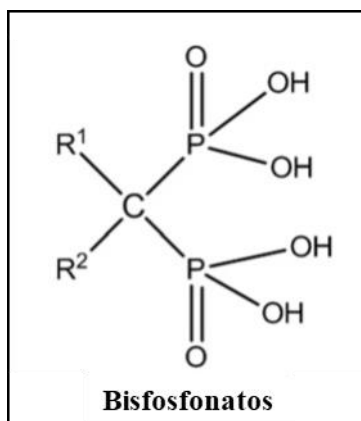
Estudos também propõem a utilização de íons inorgânicos na composição de biomateriais para que melhorem propriedades biológicas desses materiais e que atuem na regeneração óssea, como estimulando a angiogênese, por exemplo<sup>25</sup>. Dentre estes íons pode-se citar o estrôncio, atualmente utilizado em liberação controlada local ou como fármaco (ranelato de estrôncio), uma vez que atuam estimulando a formação óssea, aumentando o número de osteoblastos e inibindo a atividade de osteoclastos<sup>19,26</sup>. Outro íon que pode ser citado é o cobalto, que atua também estimulando angiogênese, porém de maneira diferente, induzindo a condição de hipóxia<sup>25,27</sup>.

Fármacos da classe bisfosfonatos (alendronato, etidronato, risedronato e zoledronato), apresentados na Figura 4, são a maior classe de fármacos utilizados no tratamento de osteoporose e também são aplicados na engenharia de tecido. Apresentam estrutura molecular básica similar, onde apenas se diferenciam dependendo do grupo funcional nas posições R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup>. Atuam, retardando a reabsorção óssea e inibindo a atividade de osteoclastos, desta maneira, aumentando a densidade óssea e reduzindo os riscos de fraturas<sup>21,28-30</sup>. Os bisfosfonatos apresentam grande afinidade ao tecido ósseo, garantida pela presença de dois grupos fosfatos na cadeia. Essa interação aumenta quando a molécula apresenta uma hidroxila na posição R<sup>1</sup>.

Já a cadeia lateral  $R^2$  é essencial para atividade do fármaco como inibidor de reabsorção óssea. Grupos funcionais com nitrogênio ou amina aumentam a atividade anti-reabsorção do fármaco. No caso, o alendronato apresenta uma hidroxila na cadeia  $R^1$  e uma cadeia carbônica com amina primária na posição  $R^2$  <sup>29</sup>.

Estudos associam estes fármacos a biomateriais de fosfato de cálcio para acelerar a mineralização óssea, realizando uma liberação local dos mesmos <sup>19,31-34</sup>.

**Figura 4** – Estrutura molecular de fármacos da classe bisfosfonatos. A família de fármacos é gerada com a substituição de diferentes grupos funcionais nas posições  $R^1$  e  $R^2$ .



Fonte: Adaptado de BOSE; TARAFDER, (2012, p. 1410) <sup>21</sup>.

#### 1.4. Engenharia de tecido

A engenharia de tecido é a área de pesquisa e desenvolvimento de tecidos do corpo humano, como ossos e componentes do esqueleto. É responsável pela fabricação de novos tecidos para reposição, recuperação ou substituição de órgãos que sofreram algum trauma ou doença. O grande potencial da regeneração do tecido ósseo facilita a atuação da engenharia de tecido <sup>35,36</sup>.

A engenharia de tecido visa desenvolver materiais que imitem o tecido ósseo e que sirvam de suporte ao tecido em volta, local para adesão de células ósseas responsáveis pela regeneração, plataforma para liberação controlada. E ainda, essa mimetização do esqueleto deve degradar-se conforme a fratura é recuperada e regenerada e seus componentes usados no crescimento do tecido <sup>35,37</sup>.

O uso de substitutos sintéticos no processo de regeneração óssea pode ser feito com três principais substâncias: hidroxiapatita (HA), outras cerâmicas e polímeros biodegradáveis. A hidroxiapatita é um biomaterial natural usado para imitar a fase mineral do osso, porém uma

característica deste material é absorção lenta, incentivando assim o uso de outras cerâmicas <sup>35,38,39</sup>.

Outros tipos de cerâmicas que podem ser usados são: fosfato tricálcico (TCP), biovidros e sulfato de cálcio. Estas, assim como a hidroxiapatita, são consideradas bioativas, favorecendo a conexão ao novo tecido ósseo formados <sup>40</sup>. O TCP é bastante similar a HA e apresenta biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de ser absorvível pelo tecido ósseo <sup>39</sup>. As características químicas, composição e estabilidade do TCP são similares a fase mineral do osso, tornando o meio fisiológico muito parecido, promovendo a osteogênese. Logo, é utilizado para fabricação de próteses e enxertos ósseos <sup>41</sup>.

Polímeros biodegradáveis também são usados na engenharia de tecido como biomaterial para compor o esqueleto <sup>35</sup>. Polímeros utilizados na engenharia de tecidos podem ser naturais ou então polímeros sintéticos, e muitos desses polímeros já foram investigados na fabricação do esqueleto ou utilizados em compósitos, como a quitosana <sup>38,42</sup>, colágeno <sup>37,43</sup>, fibra de seda <sup>44</sup>, alginato <sup>45</sup>, ácido poli-L-láctico (PLA) <sup>41,46,47</sup>, ácido poliglicólico (PGA) <sup>41</sup>, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) <sup>48-51</sup>, policaprolactona (PCL) e polietilenoglicol (PEG) <sup>41,46,47,52-55</sup>. Estes possuem propriedades variadas, como degradabilidade e diferentes características hidrofílicas-hidrofóbicas, assim, ao combiná-los pode-se obter o material ideal para utilização da engenharia de tecido, melhorando a fragilidade e resistência do material, e ainda no formato ideal para encaixar-se na fratura <sup>21,39</sup>.

Atualmente compósitos de polímero e cerâmica são desenvolvidos para melhorar as propriedades mecânicas, biodegradabilidade e bioatividade do material que será aplicado na engenharia de tecidos. Além disso, esses compósitos possibilitam aprimorações para melhores resultados na regeneração óssea, ao incorporar e liberar de agentes osteogênicos <sup>18,41,56</sup>.

#### **1.4.1. Cerâmica de fosfato de cálcio**

As cerâmicas de fosfato de cálcio são amplamente utilizadas na engenharia de tecido por apresentarem propriedades importantes e necessárias para a regeneração óssea, as quais são apresentadas na Tabela 1 <sup>18,57</sup>.

O fosfato tricálcico (TCP),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , apresenta grande aplicação na fabricação de esqueletos ou enxertos ósseos consequente das suas características, consideradas importantes para a regeneração óssea. É um material considerado bioativo, uma vez que no seu processo de dissolução libera íons cálcio e potássio, os quais estimulam a formação de tecido ósseo e facilitam o recobrimento da cerâmica por células responsáveis pela regeneração óssea <sup>18,40</sup>. Além disso, é biocompatível devido sua composição e similaridade química ao tecido ósseo,

reduzindo resposta inflamatória e risco de infecções do tecido que está em contato. O TCP é uma alternativa na engenharia de tecidos para substituir materiais usados em implantes atualmente, como metais, ossos de origem animal ou do próprio paciente <sup>18,57,58</sup>.

**Tabela 1** – Propriedades das cerâmicas de fosfato de cálcio importantes para regeneração óssea.

<b>Propriedade</b>	<b>Definição / Função</b>
Bioatividade	Capacidade inerente ao material de participar de reações biológicas específicas ou ter efeito em tecidos vivos
Biocompatibilidade	Capacidade do material de atuar com uma resposta adequada ao hospedeiro em uma aplicação específica
Fixação Bioativa	Superfícies reativas formam ligação química com o osso, minimizando assim a reação inflamatória
Bioestabilidade	Capacidade do material de manter suas propriedades <i>in vivo</i>
Cristalinidade	Maior nível de cristalinidade previne a rápida reabsorção (dissolução) da biocerâmica nos fluídos corporais
Osteointegração	Ancoragem direta do implante pela formação de tecido ósseo em volta, sem o crescimento de tecido fibroso na interface osso/implante
Osteocondução	Capacidade de fornecer suporte para a formação de novo osso
Osteoindução	Processo de indução da osteogênese. Significa que células primárias, não-diferenciadas e pluripotentes são de alguma forma estimuladas a diferenciar-se em células formadoras de osso
Reabsorção	Degradação gradual com o passar do tempo para substituição do biomaterial com tecido ósseo natural hospedeiro
Capacidade Terapêutica	Modelos para a liberação controlam <i>in situ</i> de medicamentos e fatores de crescimento
Molhabilidade	Propriedade que indica a capacidade do material de atrair e repelir moléculas de água

**Fonte:** Adaptado de ELIAZ; METOKI (2017, p. 15) <sup>18</sup>.

Bioatividade, biocompatibilidade, assim como a hidrofiliabilidade (molhabilidade) das cerâmicas de fosfato de cálcio implicam em uma boa aderência e proliferação de células, assim como a integração e absorção das células (como células tronco mesenquimais) à estrutura, resultando em uma maior osteocondução e osteoindução <sup>18</sup>. A capacidade osteocondutora do TCP decorre pelo crescimento de células osteoprogenitoras em torno e através do biomaterial, o que facilita a formação do tecido <sup>39</sup>. A alta porosidade facilita sua reabsorção e o crescimento de tecido ósseo, pois, os poros permitem a maior fixação e adesão celular devido ao aumento da área superficial. Assim, o processo de fixação do material, deposição celular, formação de tecido ósseo e, finalmente, a osteointegração do material são aceleradas <sup>18</sup>. Os poros, além de melhorar a aderência de células nas cerâmicas de fosfato de cálcio, possibilitam a incorporação e retenção de fármacos quimicamente ou fisicamente, permitindo a liberação gradual e controlada no local de aplicação do material <sup>21</sup>.

Por fim, a osteointegração da cerâmica TCP é promovida devido à alta porosidade, característica que proporciona maior superfície de contato do material com fluidos corporais.



Desta maneira, ocorre uma maior fixação do material e uma melhor adesão celular. A sua taxa de dissolução e reabsorção no sistema fisiológico é favorecida, seguida da substituição por novo tecido ósseo, processo semelhante à remodelação óssea<sup>18,57-59</sup>.

O TCP se apresenta em quatro polimorfos:  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha'$  e  $\gamma$ . As fases  $\alpha'$  e  $\gamma$  são difíceis de serem preparadas devido a necessidade de alta temperatura (fase  $\alpha'$ ) e alta pressão (fase  $\gamma$ ). A fase  $\alpha$  é estável nas temperaturas 1125-1430°C, logo apresenta problemas de estabilidade e sua degradação é rápida. A fase  $\beta$ , é estável em temperaturas abaixo de 1125°C e seu processo de fabricação é mais simples e conhecido<sup>60,61</sup>. O fosfato tricálcico na fase  $\beta$ , também conhecido como  $\beta$ -TCP, é considerado osteocondutivo e osteoindutivo, pois apresenta baixa energia superficial em relação às cerâmicas de fosfato de cálcio em geral, que pode provocar sua precipitação e dissolução em meios iônicos aquosos, como sangue<sup>18</sup>. Então, é a fase mais estudada e aplicada como enxertos para reconstituição óssea.

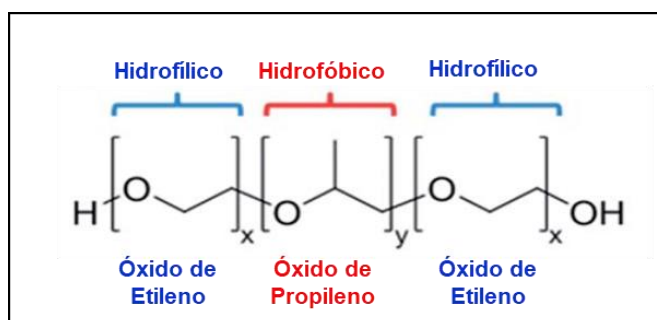
#### 1.4.2. Polímeros

Os polímeros são investigados para aplicação em engenharia de tecido, como biomateriais, devido às suas diferentes estruturas químicas, presença de diferentes grupos funcionais em suas cadeias, morfologia e propriedades que permitem controle do preparo molecular. A utilização de polímeros dependerá da biocompatibilidade e características destes como biomaterial<sup>36,40</sup>. A funcionalidade dos polímeros é utilizada em diferentes aplicações, como suporte de tecidos, local para adesão de células, plataforma para liberação controlada de fármacos, células ou moléculas bioativas<sup>35</sup>.

Os polímeros biodegradáveis e bioabsorvíveis apresentam vantagens, uma vez que não é necessária a remoção cirúrgica do implante<sup>36,40</sup>. Um exemplo de copolímero biodegradável muito utilizado atualmente na engenharia de tecido e em processos de liberação controlada de fármaco, é o polímero comercial Pluronic®. Sua estrutura é composta de tribloco polimérico, anfifílico, com propriedades como não toxicidade, biocompatibilidade e solubilidade em água, que favorecem seu emprego na engenharia de tecidos<sup>62</sup>.

O Pluronic® é uma classe de copolímeros constituído pelo polímero hidrofílico poli(óxido de etileno) (PEO) e pelo polímero hidrofóbico poli(óxido de propileno) (PPO), que se estruturam em tribloco<sup>63,64</sup>. Este triblocos são organizados da seguinte maneira: PEO<sub>m</sub>-PPO<sub>n</sub>-PEO<sub>m</sub>, como exemplificado na Figura 5<sup>65,66</sup>.

**Figura 5** – Representação da estrutura do Pluronic<sup>®</sup>. As letras X e Y representam o número de unidades de óxido de etileno e óxido de propileno na cadeia do copolímero, respectivamente.



**Fonte:** Adaptado de PITTO-BARRY; BARRY, (2014, p. 3292) <sup>66</sup>.

O bloco pode ser composto por diferentes razões molares entre os segmentos hidrofílico e hidrofóbico <sup>63</sup>. As propriedades químicas e físicas do material dependerão da extensão das cadeias de PEO e PPO que compõem o bloco, suas concentrações e o ambiente em que o bloco está disposto <sup>66,67</sup>. Assim, Pluronic<sup>®</sup> é caracterizado conforme sua hidrofiliicidade, dado por um valor de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB, do inglês) <sup>63</sup>. Exemplos de Pluronic<sup>®</sup> são apresentados na Tabela 2, indicando a quantidade de PEO e de PPO presentes na cadeia, a massa molecular e o valor de HLB para cada tribloco <sup>66</sup>.

**Tabela 2** – Característica de Pluronic<sup>®</sup>. Número de unidades dos polímeros PEO e PPO, massa molar e valor de HLB para cada bloco

Pluronic <sup>®</sup>	Número médio de unidades de PEO	Número médio de unidades de PPO	Massa Molar	HLB
L61	4,55	31,03	2000	3
L121	10,00	68,28	4400	1
F127	200,45	65,17	12600	22
F68	152,73	28,97	8400	29
F87	122,50	39,83	7700	24
P105	73,86	56,03	6500	15
P123	39,20	69,40	5750	8

**Fonte:** Adaptado de PITTO-BARRY; BARRY, (2014, p. 3293) <sup>66</sup>.

O Pluronic<sup>®</sup> é utilizado em sistemas de liberação controlada de fármacos devido à sua capacidade de transportar fármacos pelo corpo humano, inclusive através de barreiras celulares <sup>63</sup>. No sistema biológico, a dissolução do Pluronic<sup>®</sup> é lenta, permitindo sua maior resistência no organismo.

A utilização do Pluronic<sup>®</sup> ocorre associando-o com diversos medicamentos e em variadas aplicações, como aplicação com medicamentos para o tratamento de câncer <sup>63,66</sup>,

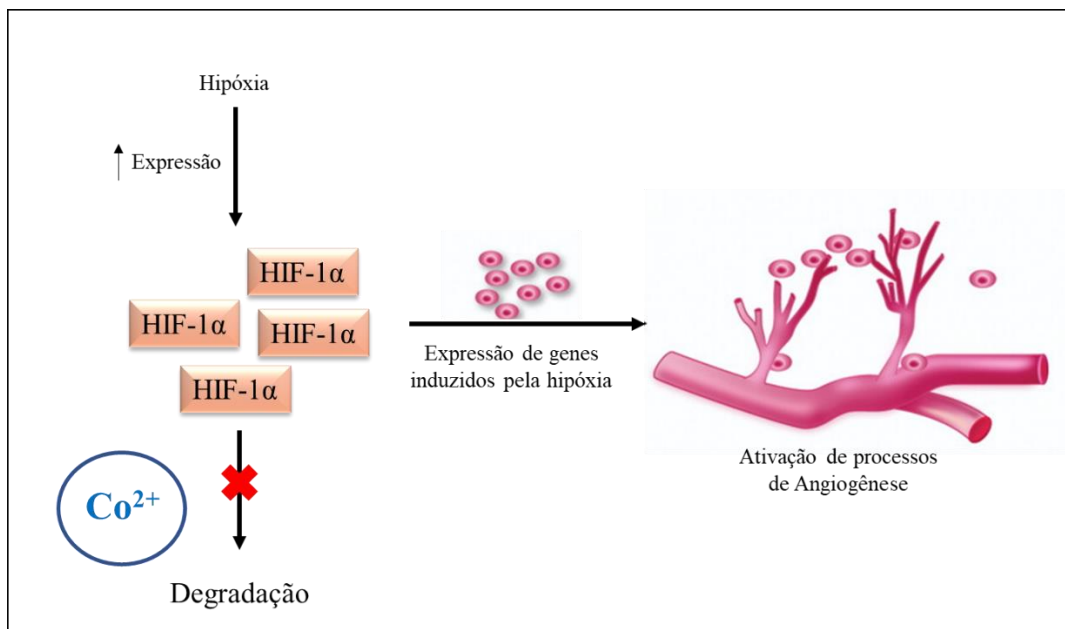
entrega de medicamentos em órgãos específicos, melhora da biodisponibilidade e atuação do fármaco no organismo <sup>63</sup>, entrega de gene na célula <sup>66</sup>, inibidor de proteínas da membrana celular <sup>68</sup> e encapsulação de células <sup>62,65</sup>.

### 1.4.3. Cobalto

Assim como a engenharia de tecido, fármacos e agentes osteogênicos são muito importantes para o tratamento e recuperação de fraturas ósseas.

O íon cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ) está presente em traços no corpo humano como parte da vitamina B12 e atua como cofator de diversos metabolismos proteicos. Íons  $\text{Co}^{2+}$  mimetizam ambientes celulares com baixa oxigenação (hipóxia), ao estabilizarem a expressão de fatores de indução de hipóxia-1a (HIF-1 $\alpha$ ) evitando sua degradação <sup>69</sup>. Nesta condição de baixa oxigenação, o fator HIF-1 $\alpha$  inicia a expressão de genes responsáveis por diversos processos relacionados à angiogênese, aumentando o número de vasos sanguíneos, conseqüentemente, a irrigação sanguínea neste local em hipóxia. Como resultado, ocorre uma maior proliferação e diferenciação de células responsáveis pela regeneração do tecido e a formação de tecido ósseo <sup>69-73</sup>. O esquema de mimetização de hipóxia por íons  $\text{Co}^{2+}$  é apresentado na Figura 6.

**Figura 6** – Representação da mimetização de hipóxia por íons cobalto. Mecanismo de ativação da angiogênese.



**Fonte:** Autora.

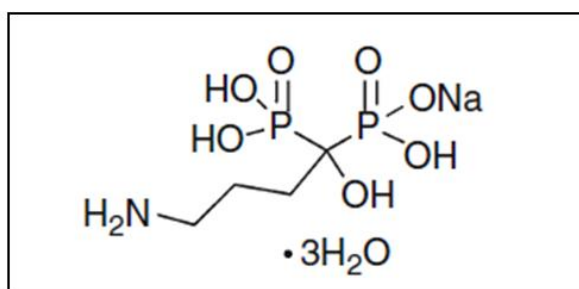
Estudos com este íon, apresentam resultados promissores na área de regeneração óssea, incluindo testes realizados *in vitro* <sup>74,75</sup>. De tal modo propõe-se a liberação controlada de íons

cobalto, atuando como um fármaco, para estimular a irrigação sanguínea na região da fratura óssea, e assim aumentar o número de osteoblastos presentes, acelerando o processo de regeneração.

#### 1.4.4. Alendronato

O alendronato é um fármaco que compõe a última geração de remédios ingeríveis para o tratamento e prevenção da osteoporose. Pertence à classe dos bisfosfonatos, fármacos mais utilizados na atualidade neste tratamento. Em particular, a molécula de alendronato, apresentada na Figura 7, possui um grupo hidroxila e uma cadeia com grupo amina ligadas ao carbono central, que permite a ligação e o aumento de afinidade da molécula à fase cristalina do osso. Desta maneira, o alendronato compõe o grupo de bisfosfonatos nitrogenicos <sup>76,77</sup>.

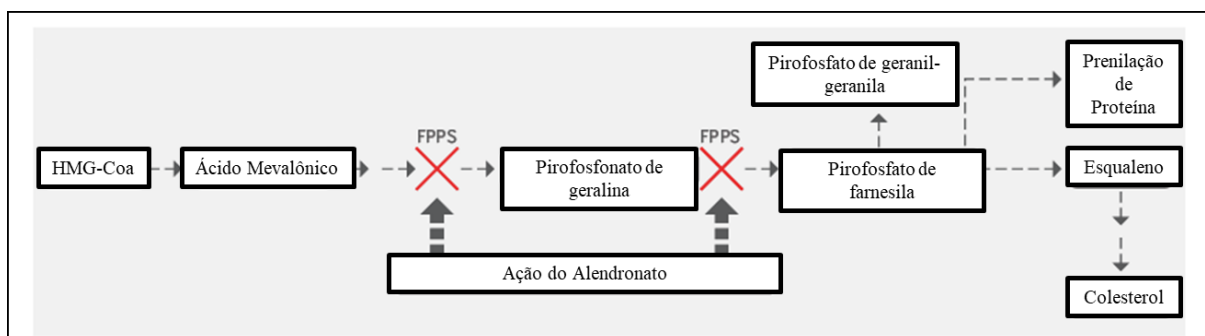
**Figura 7** – Estrutura química do alendronato trihidratado.



**Fonte:** DOCA et al., (2016, p. 190) <sup>77</sup>.

Este fármaco atua inibindo a atividade de osteoclastos e acelerando a degradação desta célula, por meio de um mecanismo que inibe a síntese da enzima farnesil pirofosfato (FPPS) nos osteoclastos. Esta enzima pertence a via mevalonato, que tem importância para a produção de colesterol e outros metabólitos. Sem a ação dessa enzima, a produção de colesterol e dos seus intermediários é prejudica. A inibição dessa via, leva a desregulação nas atividades celulares de osteoclastos que dependem da produção de proteínas como proteínas geranylgeraniladas (GGPP) para atividades normais, levando a apoptose de osteoclastos <sup>28,78,79</sup>. A Figura 8 está representado o mecanismo de ação do alendronato.

**Figura 8** – Estrutura química do alendronato trihidratado.



Fonte: Adaptado de MARAKA; KENNEL, (2015, p. 2) <sup>126</sup>.

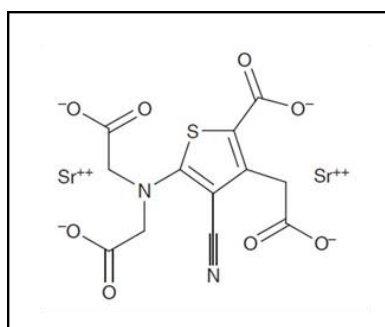
Aplicações utilizando o fármaco alendronato apresentam resultados promissores, principalmente em estudos de liberação controlada, uma vez que seus efeitos colaterais passam a ser reduzidos. Além disso, a associação deste fármaco à cerâmicas de fosfato de cálcio, como por exemplo hidroxiapatita, são muito utilizadas, devido a afinidade entre os materiais <sup>23</sup>.

#### 1.4.5. Ranelato de Estrôncio

Dentre os fármacos estudados para tratamento de osteoporose pós-menopausa, o ranelato de estrôncio apresenta-se promissor no tratamento uma vez que atua tanto como agente anti-reabsorção, mas também como agente anabólico <sup>1</sup>.

O ranelato de estrôncio é um sal de estrôncio divalente de ácido ranélico, indicado na Figura 9. Determinou-se que é capaz de aumentar ou manter a diferenciação de osteoblastos, aumentando a formação óssea, e ao mesmo tempo, inibir e promover a morte celular de osteoclastos, inibindo a reabsorção do osso, regulando e favorecendo a formação de novo tecido ósseo <sup>80,81,82</sup>.

**Figura 9** – Estrutura química do ranelato de estrôncio.

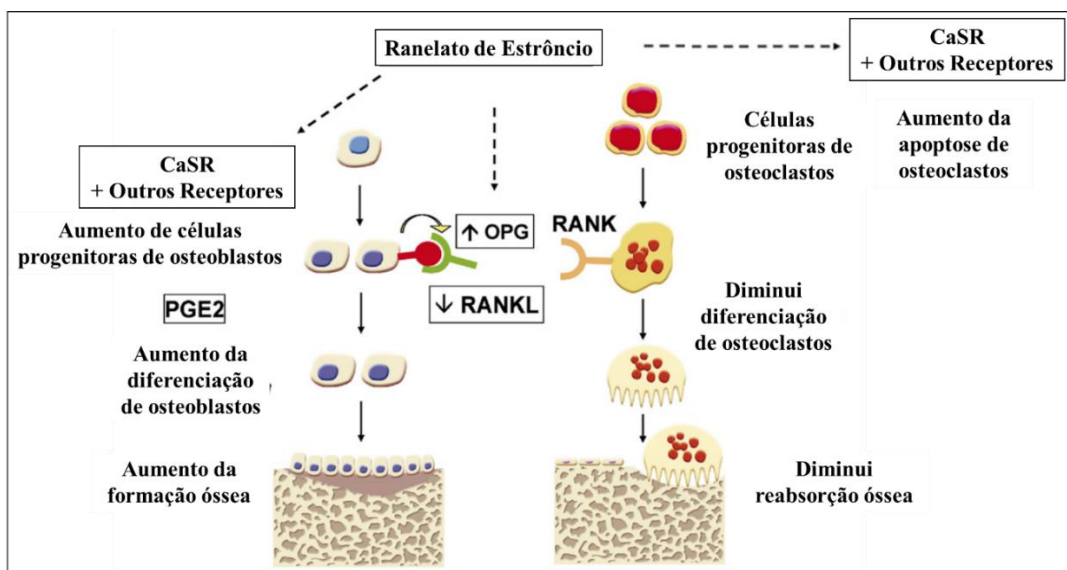


Fonte: DEEKS; DHILLON, (2010, p. 735) <sup>81</sup>.

No mecanismo de ação do ranelato de estrôncio relacionado ao aumento da formação de tecido ósseo, íons estrôncio, podem ativar o receptor sensível ao cálcio (CaSR), assim como íons cálcio ativam-no fisiologicamente. Este receptor, por sua vez, ativa uma série de receptores que promovem a replicação e diferenciação de osteoblastos <sup>81-84</sup>. Íons estrôncio estão envolvidos em outro mecanismo de diferenciação de osteoblastos, relacionado ao sinalizador Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). O PGE<sub>2</sub> é produzido por osteoblastos, e a ação dos íons estrôncio resulta no aumento da sua produção, e assim uma maior diferenciação de células em osteoblastos <sup>82</sup>. Esses mecanismos são apresentados na Figura 10.

O mecanismo de inibição de osteoclastos envolve o receptor expresso em osteoclastos e seu ligante. O receptor ativador do fator kappa B (RANK) é ativado pelo ligante RANKL, e assim promove a formação e diferenciação de osteoclastos. O ligante RANKL também é atraído pela proteína osteoprotegerina (OPG), produzida por osteoblastos e seus precursores, desfavorecendo sua ligação com o receptor RANK, regulando a diferenciação de osteoclastos. A relação RANKL/OPG é essencial para o controle da formação de osteoclastos. O ranelato de estrôncio desregula a expressão do ligante RANKL e aumenta a expressão de OPG, diminuindo a relação RANKL/OPG, inibindo a diferenciação de osteoclastos <sup>82</sup>. Além disso, a ativação do CaSR ativa receptores que apresentam efeito de indução do apoptose de osteoclastos <sup>80,81</sup>. Mecanismos também são apresentados na Figura 10.

**Figura 10** – Mecanismos de ação do ranelato de estrôncio em células do tecido ósseo.



**Fonte:** Adaptado de MARIE, (2007, p. S7) <sup>82</sup>.

Estudos realizados *in vitro* indicam que baixa dose de ranelato de estrôncio, cerca de 1 mmol/L, aplicadas em um período de 24 horas apresentam efeitos positivos na replicação e diferenciação de osteoblastos, além de inibir a diferenciação de células a osteoclastos. A atividade do ranelato de estrôncio também resultou em efeitos positivos na formação de matriz extracelular óssea, componentes orgânicos do tecido ósseo (como colágeno) e em testes *in vivo* em diferentes ordens de animais <sup>81,83</sup>.

O medicamento reduz efetivamente o risco de fraturas nos pacientes com osteoporose pós-menopausa, uma vez que melhora a geometria, força, microestrutura e a qualidade do tecido ósseo <sup>81</sup>. O ranelato de estrôncio mostrou-se, em diversos estudos, um tratamento efetivo na redução de fraturas na coluna vertebral e quadril <sup>83</sup>. Estudos clínicos mostram que o ranelato de estrôncio reduz em 49% o risco de novas fraturas na coluna vertebral depois de um ano, e em 41% depois de 3 anos <sup>1</sup>.

### 1.5. Drug delivery

A fim de unificar os dois tratamentos eficazes para a recuperação de fraturas ósseas, implementa-se a liberação controlada de fármacos em enxerto ósseo. Esta é uma nova classe de tratamento mostrando-se mais eficiente e com efeitos colaterais reduzidos <sup>34</sup>. Este fator muito importante, uma vez que medicamentos utilizados atualmente no tratamento de osteoporose, apresentam muitos efeitos colaterais, principalmente pelo uso por longos períodos. O fármaco ranelato de estrôncio, por exemplo, apresenta sinais de dores de cabeça, tromboembolismo venoso, perda de memória, convulsões e náusea em pacientes que administram o fármaco via oral. O Alendronato, também apresenta diversos relatos de efeitos colaterais pela sua ingestão, como náusea, diarreia, formação de úlceras e problemas no sistema nervoso central <sup>77-79</sup>.

A entrega de um fármaco em um local específico do corpo é o objetivo de um sistema de *drug delivery*, que deve superar as barreiras químicas e biológicas que dificultam a atuação do fármaco no corpo. As vantagens da liberação local de fármacos é a utilização de doses terapêuticas, no local exato, durante um período definido de tempo, com um fluxo controlado e contínuo, evitando-se assim a constante ingestão dessas substâncias <sup>85,86</sup>.

Diversos materiais podem ser utilizados como suporte para um sistema de liberação controlada, como cerâmicas, polímeros ou compósitos, que se apresentam nas formas de hidrogéis, grãos, micropartículas ou blocos <sup>19</sup>.

As propriedades físico-químicas do fármaco e sua relação com o suporte irão influenciar no método de entrega que será utilizado <sup>87</sup>. O sistema de liberação controlada mais utilizado realiza a incorporação do fármaco junto ao biomaterial. Desta maneira o biomaterial promove

um aumento na solubilidade, na estabilidade metabólica e melhora o tempo de circulação do fármaco no sistema <sup>63</sup>.

Os desafios no tratamento de fraturas causadas pela osteoporose são muitos devido à falta de conhecimento sobre a fragilidade óssea e da progressão da doença. A fim de minimizar as falhas na utilização de enxertos ou problemas de fixação, a liberação local de medicamentos ou qualquer agente que favoreça a osteogênese, são opções para melhorar a recuperação de fraturas causadas pela osteoporose. Assim, o tratamento de fraturas com implantes que realizem a liberação local de fármacos estimula o crescimento ósseo e diminui o tempo de tratamento. Liberação controlada pode reduzir significativamente o tempo de recuperação e reduzir custo de tratamentos <sup>19</sup>.



## 2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo contribuir com o tratamento alternativo de fraturas causadas pela osteoporose, a partir do preparo de enxerto ósseo associado a um sistema de liberação controlada de agentes osteogênicos que aceleram o processo de regeneração óssea, e assim, atuam no combate à osteoporose. Apresenta como objetivos específicos:

- Preparar enxertos de cerâmica  $\beta$ -TCP revestidos com uma mistura homogênea de copolímero Pluronic<sup>®</sup> e agente osteogênico (cloreto de cobalto, alendronato e ranelato de estrôncio);
- Preparar materiais compósitos utilizando três copolímeros com diferentes valores de Balanço Hidrofílico-Lipofílico (do inglês, HLB);
- Investigar a influência do HLB do copolímero na liberação controlada de cloreto de cobalto a fim de determinar o copolímero mais adequado para a aplicação;
- Estudar a liberação dos agentes osteogênicos e a cinética associada ao processo;
- Avaliar a influência da proporção polímero: $\beta$ -TCP na liberação controlada dos fármacos alendronato e ranelato de estrôncio;
- Caracterizar enxertos pelas técnicas DRX, FTIR, DSC, TG, MEV e UV-Vis.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Reagentes e Materiais

Os reagentes e solvente utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Reagentes e solventes utilizados.

Reagentes / Solventes	Fórmula Molecular	Procedência
$\beta$ -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Preparado em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa
Pluronic <sup>®</sup> F-108	$(\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$	Sigma Aldrich, MM 14.600
Pluronic <sup>®</sup> P-123	$(\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$	Sigma Aldrich, MM 5.800
Pluronic <sup>®</sup> L-121	$(\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$	Sigma Aldrich, MM 4.400
Cloreto de cobalto (II) hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck, 99%
Alendronato de sódio trihidratado	$\text{C}_4\text{H}_{18}\text{NNaO}_{10}\text{P}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Galena
Ranelato de Estrôncio	$\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_8\text{SSr}_2$	Toronto Reasearch Chemicals (TRC)
Água Ultra Pura	$\text{H}_2\text{O}$	-
Tampão Fosfato Salino (PBS)	-	Sigma Aldrich, pH 7,4
Tetraidrofurano (THF)	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$	Merck, PA
Ácido Clorídrico	HCl	Sigma Aldrich, 37%
Tiocianato de potássio	KSCN	Synth, PA
Ninidrina	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$	-
Bicarbonato de sódio	$\text{NaHCO}_3$	Mallinkrodt, PA

**Fonte:** Autora.

Os materiais utilizados foram membranas de diálise (molecular weightcut-off 6KDa, Sigma Aldrich) e as vidrarias béquer, balão volumétrico de diversos volumes (5 mL, 10 mL, 25 mL e 100 mL), proveta graduada e tubos de ensaio.

#### 3.2. Preparo do Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic

Preparou-se um material compósito cerâmico-polímero, empregando  $\beta$ -TCP e Pluronic<sup>®</sup>, para sua utilização como sistema de liberação controlada. Preparou-se os compósitos em três proporções diferentes, a fim de determinar a melhor razão em massa entre cerâmica e polímero para a obtenção de um material homogêneo.

Para cada amostra, o Pluronic<sup>®</sup> F-108 foi adicionado a um béquer e aquecido a 60 °C em banho maria, até completa fusão do material. Adicionou-se os grãos de  $\beta$ -TCP,

homogeneizou-se a mistura e em seguida deixou-a secar a temperatura ambiente. É apresentado na Tabela 4 as proporções dos materiais preparados.

**Tabela 4** – Razão de polímero Pluronic® F-108 e grão de  $\beta$ -TCP utilizado para preparar amostras de compósito.

Amostra	Razão Polímero: $\beta$ -TCP (em massa)
1	2:1
2	1:1
3	1:2

Fonte: Autora.

### 3.3. Incorporação de Íons Cobalto na Matriz Polimérica

O preparo da matriz polimérica com os íons cobalto (II) foi realizado seguindo o método de dispersão sólida, onde o agente é disperso na matriz sólida fundida (Pluronic®). Este método é usado para aumentar a solubilidade e dissolução do agente em sistemas de liberação controlada<sup>88,98</sup>.

Foram utilizados três copolímeros Pluronic® distintos como matriz polimérica. É descrito na Tabela 5 as características de cada Pluronic®, sua composição de cadeia e valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB).

**Tabela 5** – Características de diferentes copolímeros Pluronic®: número de unidades dos polímeros PEO e PPO, massa molar e valor de HLB.

Pluronic®	Massa Molar	Média de unidades		HLB
		PEO	PPO	
F108	14600	265,5	50,3	>24
P123	5800	39,2	69,4	7 – 12
L121	4400	10,0	68,3	1 – 7

Fonte: Adaptado de ALVAREZ-LORENZO; SOSNIK; CONCHEIRO (2011, p. 1114)<sup>68</sup>.

Para cada amostra pesou-se 250 mg do Pluronic® correspondente em um béquer e aqueceu-o a 60 °C em banho maria, até a fusão completa do material. Adicionou-se  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,5% m/m) ao polímero, homogeneizou-se o material, deixando a mistura secar a temperatura ambiente.

### 3.4. Preparo do Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto

Preparou-se material compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto seguindo metodologias descritas nos itens 3.2 e 3.3. Pesou-se Pluronic® F-108 em um béquer e aqueceu-o a 60 °C em

banho maria, até a fusão completa do material. Adicionou-se  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,5% m/m) ao polímero, misturou-se até obter um material homogêneo. Adicionou-se os grãos de  $\beta$ -TCP, previamente pesados (razão em massa 1:1 / polímero:grão), misturou-se até obter um material homogêneo, deixando a mistura secar a temperatura ambiente.

### **3.5. Preparo do Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato e $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato**

No preparo dos materiais compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato, adotou-se as mesmas metodologias descritas nos itens 3.2 e 3.3. Inicialmente, pesou-se Pluronic<sup>®</sup> F-108 em um béquer e aqueceu-o a 60 °C em banho maria, até a fusão completa do material. Adicionou-se o alendronato ou ranelato de estrôncio (5% em relação a massa de grãos de  $\beta$ -TCP) ao polímero, misturou-se até obter um material homogêneo. Adicionou-se os grãos de  $\beta$ -TCP previamente pesados e misturou-se até obter um material homogêneo, deixando a mistura secar a temperatura ambiente.

Para ambos os compósitos, preparou-se dois compósitos diferentes, modificando a quantidade de polímero adicionado, com a finalidade de avaliar a influência da quantidade de polímero no perfil de liberação dos fármacos. Um deles preparou-se com razão em massa 1:1, grão:polímero ( $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1), e outro com razão em massa 2:1, grão:polímero ( $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2).

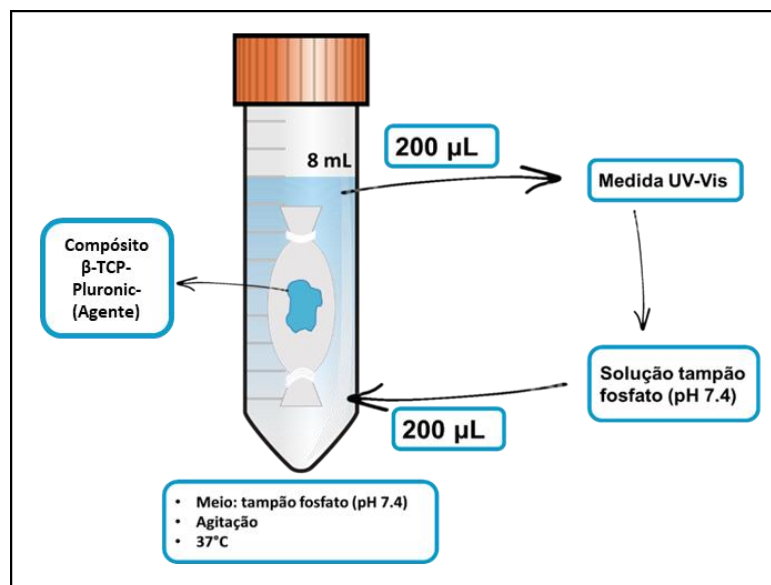
### **3.6. Estudos de Liberação**

Após o preparo dos materiais contendo os agentes de estudo, como descritos nos itens 3.3, 3.4 e 3.5, foram realizadas as liberações de íons cobalto, alendronato e ranelato de estrôncio pelo método de difusão através de membrana de diálise. Este método consiste em adicionar os compósitos em membranas de diálise segregando-os do meio, sendo estas membranas mantidas em meio de liberação específico, sob agitação e temperaturas constantes<sup>90,91</sup>. O esquema da metodologia utilizada na liberação está representado na Figura 11.

Em cada teste de liberação dos agentes, pesou-se o compósito e adicionou-o à uma membrana de diálise, contendo 0,5 mL de solução tampão fosfato (pH = 7,4). Em seguida, a membrana foi fechada e inserida em um tubo contendo 8,0 mL de solução tampão fosfato (pH = 7,4). Encubou-se o sistema a 37 °C por um período de 7 dias. Retirou-se alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  em tempos determinados das amostras incubadas, e para cada alíquota retirada, adicionou-se ao tubo novamente o mesmo volume de solução tampão. Em cada uma das alíquotas retiradas determinou-se a quantidade do agente liberado. O mesmo procedimento foi repetido com todos

os compósitos. Os testes de liberação foram realizados em triplicata, partindo de alíquotas da mesma amostra, de cada compósitos.

**Figura 11** – Representação esquemática do método de liberação.

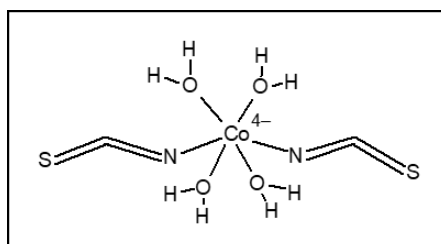


**Fonte:** Autora.

### 3.6.1. Determinação de Íons Cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ )

A determinação dos íons cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ) foi realizada por meio da reação de Vogel <sup>92-94</sup>, complexando-os com o ligante tiocianato. O complexo tiocianato de cobalto ( $\text{Co}(\text{NCS})_2(\text{H}_2\text{O})_4$ ) formado em meio aquoso (Figura 12) apresenta coloração azul, com máximo de absorção na região do ultravioleta (316 nm) e na região do visível (620 nm). Para a faixa de concentrações de cobalto em solução selecionada, de  $0,94 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $4,04 \text{ mg.L}^{-1}$ , utilizou-se o comprimento de onda de 316 nm para a quantificação. Os parâmetros da reação utilizados seguem estudos que otimizaram quantidades de reagentes e solventes, para melhor detecção do complexo em baixas concentrações <sup>95</sup>.

**Figura 12** – Estrutura do complexo Tiocianato de Cobalto.



**Fonte:** Adaptado de HADDOUB et al. (2011, p.1353) <sup>96</sup>.

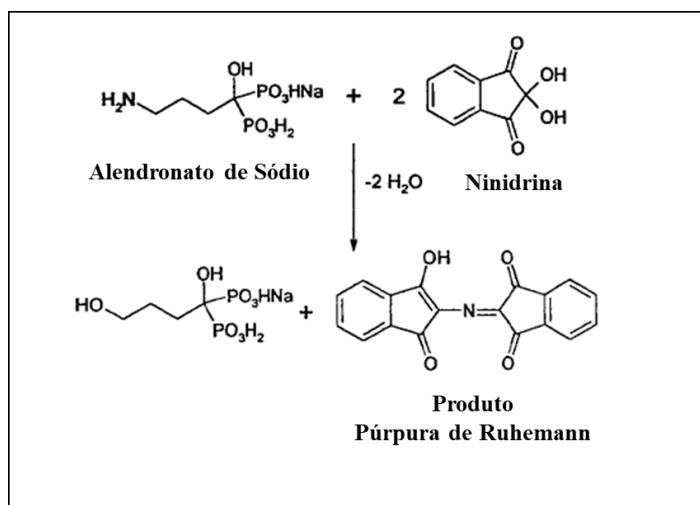
### 3.6.1.1. Curva de Calibração para Quantificação de Íons Cobalto

Inicialmente foi preparada uma solução estoque (solução-1) de cloreto de cobalto hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) em balão volumétrico de 100 mL com concentração de  $0,009 \text{ mol.L}^{-1}$ . Retirou-se nove alíquotas diferentes da solução estoque e adicionou-se em balões volumétricos de 25 mL. Em seguida, preparou-se a solução estoque (solução-2) de cloreto de cobalto hexahidratado em balão volumétrico de 25 mL com concentração de  $0,019 \text{ mol.L}^{-1}$ . Desta solução retirou-se mais três alíquotas diferentes e foram adicionadas em balão volumétrico de 25 mL, para complementar os pontos restantes da curva de calibração até a absorbância máxima esperada. Depois, adicionou-se em cada balão os reagentes tiocianato de potássio ( $0,203 \text{ mol.L}^{-1}$ ), HCl ( $0,050 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e THF (60% v/v), completando o volume com água destilada<sup>95</sup>. Analisou-se as amostras em triplicata por espectrometria no UV-Vis em um comprimento de onda de 316 nm, obtendo-se a curva de calibração em uma faixa de detecção de  $8,33 \mu\text{mol.L}^{-1}$  à  $83,82 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### 3.6.2. Determinação de Alendronato

O fármaco alendronato não possui absorbância na região do ultravioleta visível, sendo necessário a quantificação do fármaco por métodos indiretos. Utilizou-se o método baseado na reação da amina primária da molécula do alendronato com o reagente ninidrina (2,2-diidroxihidrindeno-1,3-diona), para a quantificação da quantidade de alendronato liberada do composto. A reação ocorre via desaminação oxidativa do grupo amina primária alifático do alendronato na presença de bicarbonato de sódio, seguida da condensação da ninidrina reduzida formando um produto colorido, identificado como púrpura de Ruhemann, o qual apresenta um máximo de absorbância em 568 nm<sup>97</sup>. O possível mecanismo de reação do alendronato com ninidrina é apresentado na Figura 13.

**Figura 13** – Possível mecanismo de reação do alendronato com ninidrina.



Fonte: Adaptado de TAHA; YOUSSEF (2003, p. 1446) <sup>97</sup>.

### 3.6.2.1. Curva de Calibração para Quantificação de Alendronato

Preparou-se uma solução estoque de alendronato de sódio trihidratado ( $\text{C}_4\text{H}_{18}\text{NNaO}_{10}\text{P}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) de concentração de  $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ , em balão volumétrico de 5 mL. Retirou-se seis alíquotas diferentes da solução estoque e adicionou-se em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se em cada tubo 0,5 mL de solução de bicarbonato de sódio (0,05 M) e 2,5 mL de solução 0,2% de ninidrina em metanol. Aqueceu-se os tubos, em banho maria a  $90 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 20 minutos. Completou-se o volume até 10 mL com água depois resfriar-se os tubos em temperatura ambiente <sup>97</sup>. Analisou-se as amostras em triplicata por espectrometria no UV-Vis em um comprimento de onda de 568 nm, obtendo-se a curva de calibração em uma faixa de detecção de  $18,38 \mu\text{mol.L}^{-1}$  à  $176,44 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### 3.6.3. Determinação de Ranelato de Estrôncio

A determinação do fármaco ranelato de estrôncio por UV-Vis, foi realizada segundo metodologia de análise, utilizando-se solução preparada em meio de tampão fosfato, que apresenta um máximo de absorbância em 323 nm <sup>98</sup>.

#### 3.6.3.1. Curva de Calibração para Quantificação de Ranelato de Estrôncio

Preparou-se duas soluções estoques de ranelato de estrôncio ( $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_8\text{SSr}_2$ ) de concentrações de  $0,002 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $0,0002 \text{ mol.L}^{-1}$  em balão volumétrico de 25 mL. Retirou-se sete alíquotas diferentes da solução estoque de concentração  $0,0002 \text{ mol.L}^{-1}$  e adicionou-se em um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, adicionou-se em cada balão volumétrico 1,25 mL

de ácido clorídrico (0,1 N) e completou-se o volume para 25 mL com tampão fosfato <sup>98</sup>. Analisou-se as amostras em triplicata por espectrometria no UV-Vis em um comprimento de onda de 323 nm, obtendo-se a curva de calibração em uma faixa de detecção de 3,90  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  à 77,90  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### **3.7. Técnicas Caracterização**

#### **3.7.1. Difractometria de Raios X (DRX)**

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um equipamento DIFFRAC PLUS XRD Commande, marca SIEMENS modelo D5000 (IQ/UNESP-Araraquara), com radiação  $\text{CuK}\alpha_1 = 1,5418 \text{ \AA}$  e as seguintes condições de trabalho: voltagem 40 KV, corrente 40 mA e velocidade de varredura de  $0,2^\circ \text{ min}^{-1}$ . As amostras foram preparadas a partir da amostra sólida em porta amostra de vidro.

#### **3.7.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro PerkinElmer FT-IR Frontier (IQ/UNESP-Araraquara). As amostras foram maceradas juntamente com KBr (Sigma Aldrich) para o preparo de pastilhas, utilizadas na análise por transmissão. Espectros foram obtidos com 32 varreduras na faixa de 4000 a  $400 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

#### **3.7.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Os termogramas das amostras foram obtidos em um equipamento DSC TA Instruments modelo DSC Q100 (IQ/UNESP-Araraquara). Aproximadamente 10 mg de amostra foram colocadas em porta amostra de alumínio e as amostras foram aquecidas de  $0^\circ\text{C}$  a  $350^\circ\text{C}$  com uma razão de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ , sob fluxo de nitrogênio em 50 mmHg.

#### **3.7.4. Análise Termogravimétrica (TGA)**

Análises térmicas das amostras foram realizadas em equipamento da marca Perkin Elmer, modelo Thermogravimetric Analyzer TGA 4000, em atmosfera de nitrogênio, com taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ , de 30 a  $700^\circ\text{C}$ .



### **3.7.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As micrografias eletrônicas de varredura deste trabalho foram realizadas em um microscópio JEOL modelo 7500F (IQ-UNESP Araraquara). Todas as amostras foram depositadas em fita de carbono e recobertas com ouro ou carbono.

### **3.7.6. Espectroscopia na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)**

As medidas no UV-Vis utilizadas nos estudos de liberação foram realizadas em um espectrofotômetro PDA UV/Vis da marca Perkin Elmer modelo Lambda 465 utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, com leituras em comprimento de onda de 316 nm, 568 nm e 323 nm, característicos da absorção do tiocianato de cobalto, da ninidrina e da solução de ranelato de estrôncio, respectivamente.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic

As três amostras de compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic foram preparadas e comparadas visualmente, a fim de determinar a homogeneidade da mistura. A amostra 1 foi preparada em uma razão 2:1 (polímero:grão, em massa), que indicou ter uma quantidade excessiva de polímero, uma vez que cerca de 30% da massa inicial pesada de polímero permaneceu no béquer. Para a amostra 2 utilizou-se a proporção 1:1. Neste caso obteve-se um material homogêneo e restando apenas uma pequena quantidade de polímero fundido no interior do béquer utilizado, cerca de 2% da massa inicial pesada. Portanto, não apresentou excesso de nenhum dos componentes e um aproveitamento máximo da massa pesada. Já a amostra 3 foi preparada em uma razão 1:2 (polímero:grão, em massa). Observou-se um material também homogêneo, apresentando uma camada menos espessa no entorno do grão.

Com a expectativa de empregar as melhores características dos componentes dos compósitos, porosidade da cerâmica e solubilidade do copolímero, determinou-se que os materiais 2 e 3, com características homogêneas, apresentam o recobrimento esperado mantendo-se a morfologia do grão cerâmico. Iniciou-se os estudos de seleção da matriz polimérica com o material 2, enquanto utilizou-se o material 3 com a finalidade de determinar a influência na quantidade de matriz polimérica e espessura do recobrimento do grão no perfil de liberação controlada dos agentes.

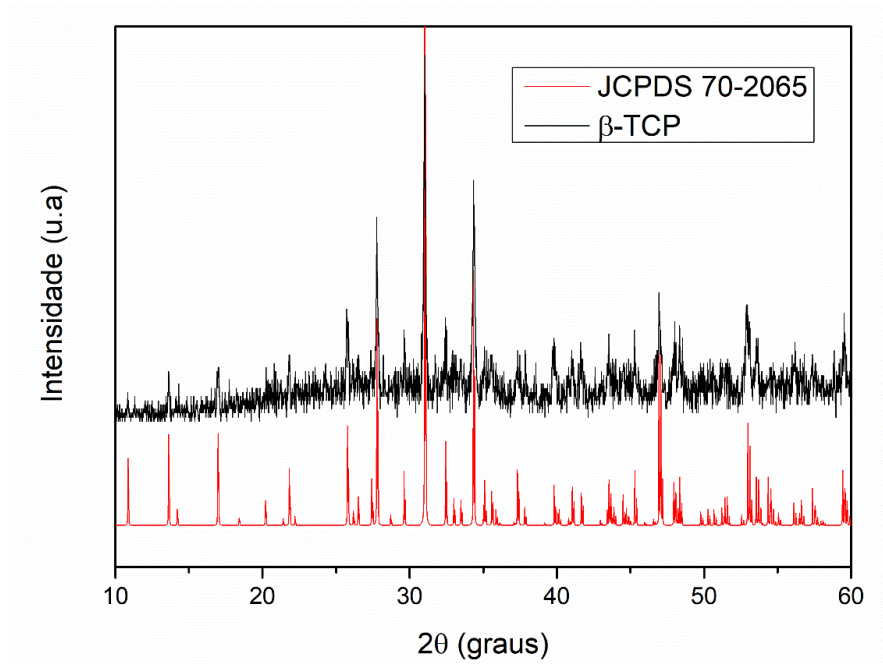
#### 4.1.1. Caracterização Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic

Os grãos de  $\beta$ -TCP foram caracterizados por DRX, FTIR, DSC, TGA e MEV, a fim de confirmar a estrutura cristalina e morfologia de fosfato de cálcio que compõe a cerâmica. Em seguida, caracterizou-se o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic com as mesmas técnicas, a fim de determinar a presença do polímero no compósito preparado.

##### 4.1.1.1. Difratometria de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X da amostra e do padrão de difração de raios X do  $\beta$ -TCP obtido no banco de dados de estrutura cristalina (JCPDS 70-2065) são apresentados na Figura 14. Observou-se que os picos característicos de difração de raios X do padrão (27,81, 31,05 e 34,39° 2 $\theta$ ) coincidem com os presentes no difratograma da amostra. Isso indica a presença de fosfato de cálcio somente na fase  $\beta$ , como esperado e desejado para o trabalho.

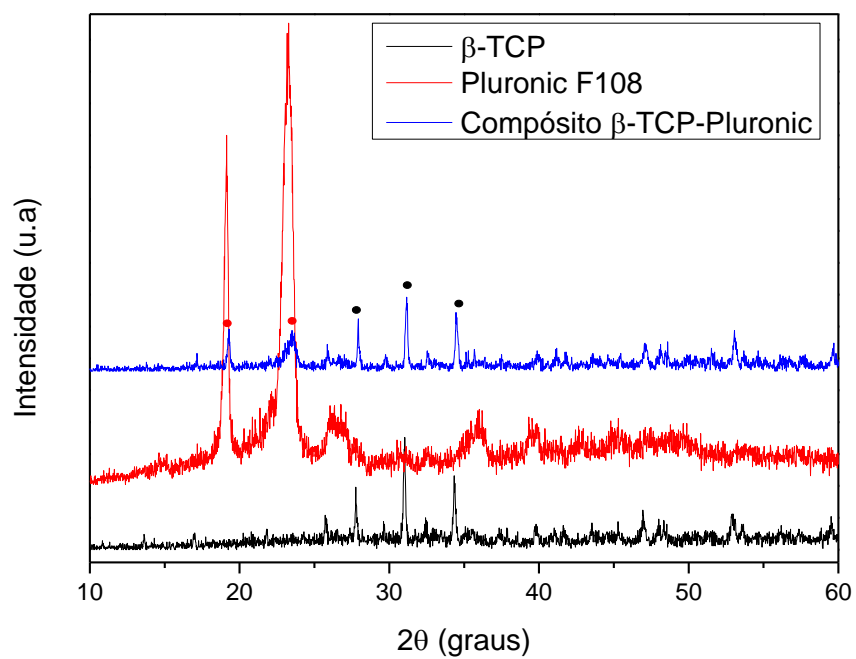
**Figura 14** – Difratoograma de raios X do grão  $\beta$ -TCP e do padrão de difração de raios X do  $\beta$ -TCP (JCPDS 70-2065).



**Fonte:** Autora.

São apresentados na Figura 15 os difratogramas do polímero Pluronic<sup>®</sup> F108 e do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic.

**Figura 15** – Difratoograma de raios X das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108 e Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic.



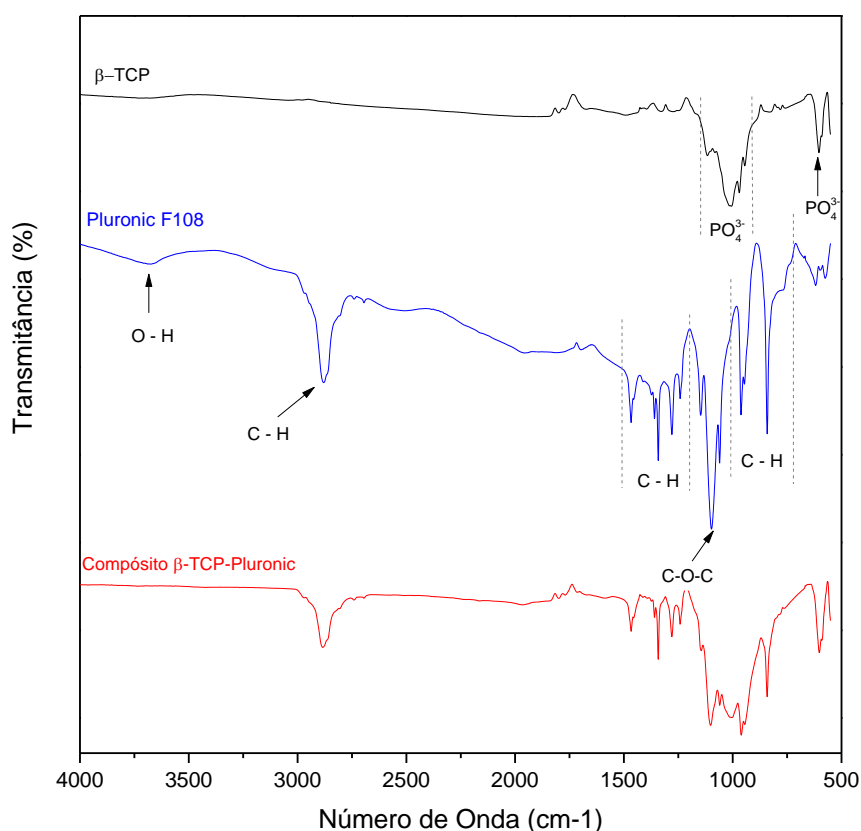
**Fonte:** Autora.

Nos difratogramas verifica-se que os picos 27,81, 31,05 e 34,39° 2 $\theta$  característicos do  $\beta$ -TCP estão presentes na amostra, indicados com círculos pretos. Pode-se conferir também que picos 19,12 e 23,26° 2 $\theta$  característicos do Pluronic® F108, indicados com círculos vermelhos, também estão presentes, comprovando a composição esperada do Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic.

#### 4.1.1.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Realizou-se FTIR do compósito, do polímero e do  $\beta$ -TCP, a fim de confirmar a presença dos dois componentes no compósito ( $\beta$ -TCP-Pluronic). Os espectros de espectroscopia vibracional na região do infravermelho para as três amostras são apresentados na Figura 16.

**Figura 16** – Espectro na região do infravermelho das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108 e Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic.



**Fonte:** Autora.

No espectro do  $\beta$ -TCP, as bandas entre 900 e 1200  $\text{cm}^{-1}$  são referentes aos estiramentos do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  e a banda em 605  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída à vibração do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ . Essas bandas estão associadas ao TCP na fase  $\beta$ , evidenciando a sua presença no material estudado

No espectro do copolímero Pluronic<sup>®</sup> F108, identifica-se a banda em 1097 cm<sup>-1</sup> atribuída a deformação axial C-O-C dos éteres presentes na cadeia do polímero. As bandas entre 1200 e 1500 cm<sup>-1</sup> são referentes a deformação angular C-H. Entre 700 e 950 cm<sup>-1</sup> atribui-se as bandas a rotação da ligação C-H e em 2879 cm<sup>-1</sup> a deformação axial C-H. Também é observada uma banda fraca em 3677 cm<sup>-1</sup> do grupo hidroxila ao final da cadeia do copolímero, onde sua intensidade dependerá da quantidade de ligações hidrogênio intermoleculares entre as cadeias poliméricas<sup>102,103</sup>.

Analisando o espectro do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic, observa-se a presença de bandas referentes tanto ao  $\beta$ -TCP, quanto ao Pluronic<sup>®</sup> F108, indicando, assim, a presença de ambos no compósito. A análise quantitativa do espectro permite identificar com maior intensidade a vibração do grupo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> em 602 cm<sup>-1</sup> referente ao  $\beta$ -TCP e a banda em 1098 cm<sup>-1</sup> atribuída a deformação axial C-O-C. As bandas entre 1200 e 1500 cm<sup>-1</sup> são referentes a deformação angular C-H e em 2885 cm<sup>-1</sup> a deformação axial C-H referentes ao copolímero Pluronic<sup>®</sup> F108. Na Tabela 6 são resumidas as atribuições de bandas dos espectros de absorção na região do infravermelho para as três amostras.

**Tabela 6** – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.

Amostra	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	
$\beta$ -TCP	~900-1200	Estiramento PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	605	Vibração PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	3677	O-H
Pluronic <sup>®</sup> F108	2879	Deformação axial C-H
	~1200-1500	Deformação angular C-H
	1097	Deformação axial C-O-C
	~700-950	Rotação C-H
Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic	1008	Estiramento PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	605	Vibração PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	2885	Deformação axial C-H
	~1200-1500	Deformação angular C-H
	1101	Deformação axial C-O-C
	~700-9500	Rotação C-H

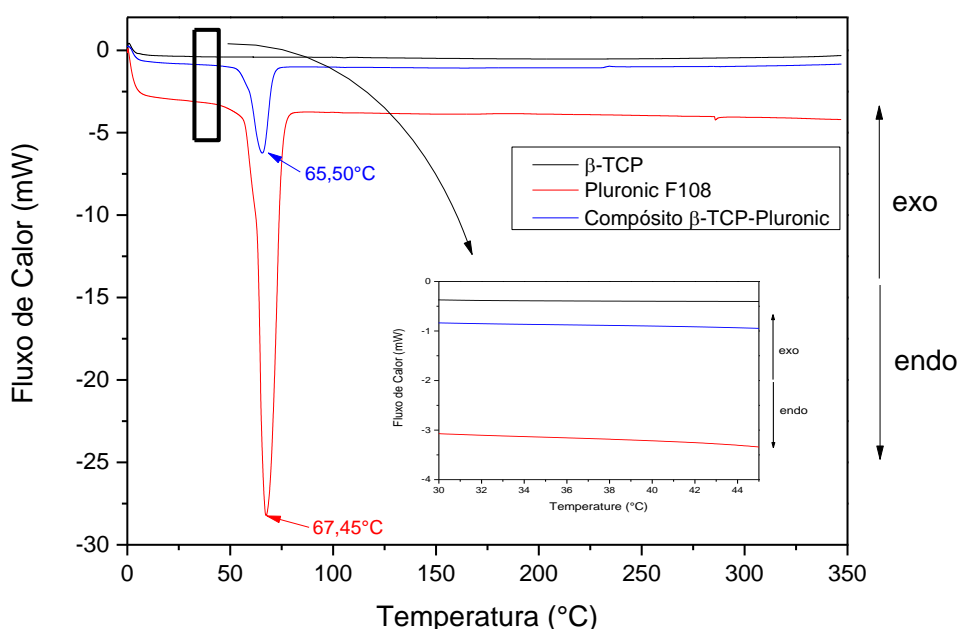
Fonte: Autora.

#### 4.1.1.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

É apresentado na Figura 17 os termogramas do grão de  $\beta$ -TCP, do polímero Pluronic<sup>®</sup> F108 puro e do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic.

O termograma do grão de  $\beta$ -TCP não apresentou nenhum evento térmico, uma vez que é composto apenas de cerâmica de fosfato de cálcio, que na fase  $\beta$  é estável em temperaturas abaixo  $1125^{\circ}\text{C}$  <sup>59</sup>. No termograma do Pluronic<sup>®</sup> F108 é apresentado apenas um evento térmico em  $67,45^{\circ}\text{C}$  correspondente a sua fusão. No termograma do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic há apenas um evento térmico em  $65,5^{\circ}\text{C}$  que corresponde a fusão do polímero. Observa-se uma diminuição na temperatura de fusão do polímero quando este está no compósito. Isso ocorre, pois, o polímero está recobrindo o grão de  $\beta$ -TCP, apresentando-se em um volume menor em relação a superfície de contato do que na amostra de polímero puro. Logo o calor difunde-se mais facilmente e sua fusão acontece em uma temperatura menor.

**Figura 17** – Curvas de DSC das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108 e Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic.



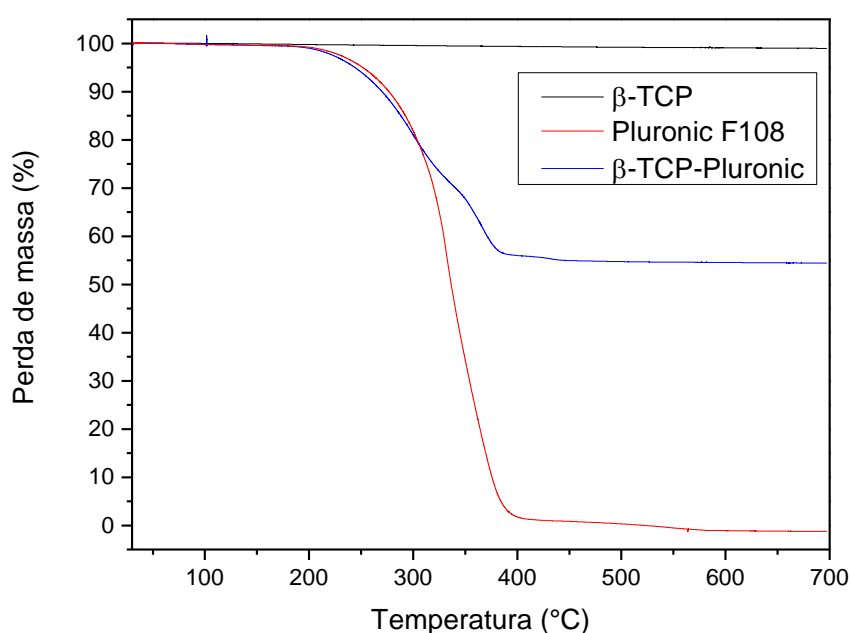
**Fonte:** Autora.

É apresentado na Figura 17 a ampliação dos termogramas entre as temperaturas de 30 e  $45^{\circ}\text{C}$  e confirma-se que não ocorre nenhum evento térmico nesta faixa de temperatura, para o  $\beta$ -TCP e Pluronic<sup>®</sup> F108, individualmente, assim como para o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic. Conclui-se que o material é estável em  $37^{\circ}\text{C}$ , temperatura que serão realizados os testes de liberação controlada dos agentes osteogênicos, garantindo assim que não haverá degradação ou desestabilização do compósito durante os testes.

#### 4.1.1.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

Utilizando o princípio da análise térmica, alteração de massa com variação de temperaturas, determinou-se as características de estabilidade e decomposição dos materiais  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108 e compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic. As curvas termogravimétricas (TG) do grão de  $\beta$ -TCP, do polímero Pluronic<sup>®</sup> F108 puro e do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic são apresentadas na Figura 18. Na Figura 19 (a) e (b) são apresentadas as TG e DTG obtidas para as amostras Pluronic<sup>®</sup> F108 e compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic, respectivamente.

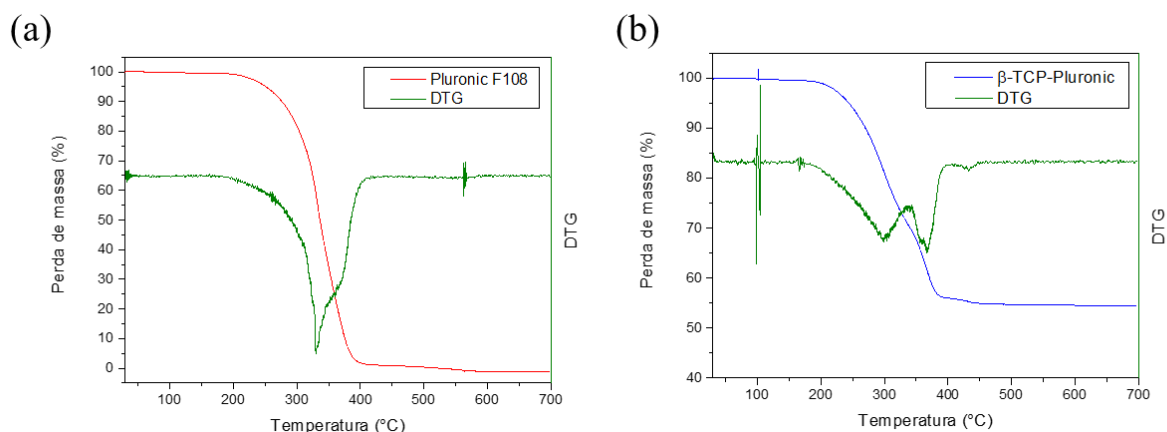
**Figura 18** – Curvas de TG das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108 e Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic.



**Fonte:** Autora.

O grão de  $\beta$ -TCP não apresentou nenhuma perda entre as temperaturas de 30 °C e 700 °C, uma vez que a fase  $\beta$  da cerâmica de fosfato de cálcio é estável em temperaturas abaixo de 1125°C<sup>59,106</sup>. O copolímero apresentou perda de massa, com o início da sua decomposição em 200 °C até 400 °C, referente a sua decomposição<sup>107</sup>. Pode-se verificar na Figura 19 (b), que a perda de massa referente a decomposição do copolímero no compósito ocorre em duas etapas. Segundo a literatura, estes eventos ocorrem, pois, a estrutura do copolímero apresenta-se parcialmente bloqueada ou forma-se uma nova reticulação em sua cadeia após as etapas iniciais de degradação<sup>104,105</sup>. A primeira etapa de degradação, de 200 °C a 330 °C, corresponde a quebra de ligações de hidrogênio intermoleculares, com uma perda de massa de cerca de 29%. Em seguida, de 330 °C a 400 °C, ocorre a quebra das ligações da cadeia polimérica, com perda de massa de 14%<sup>108</sup>.

**Figura 19** – Curvas de TG-DTG das amostras (a) Pluronic® F108 e (b) Composito  $\beta$ -TCP-Pluronic.



**Fonte:** Autora.

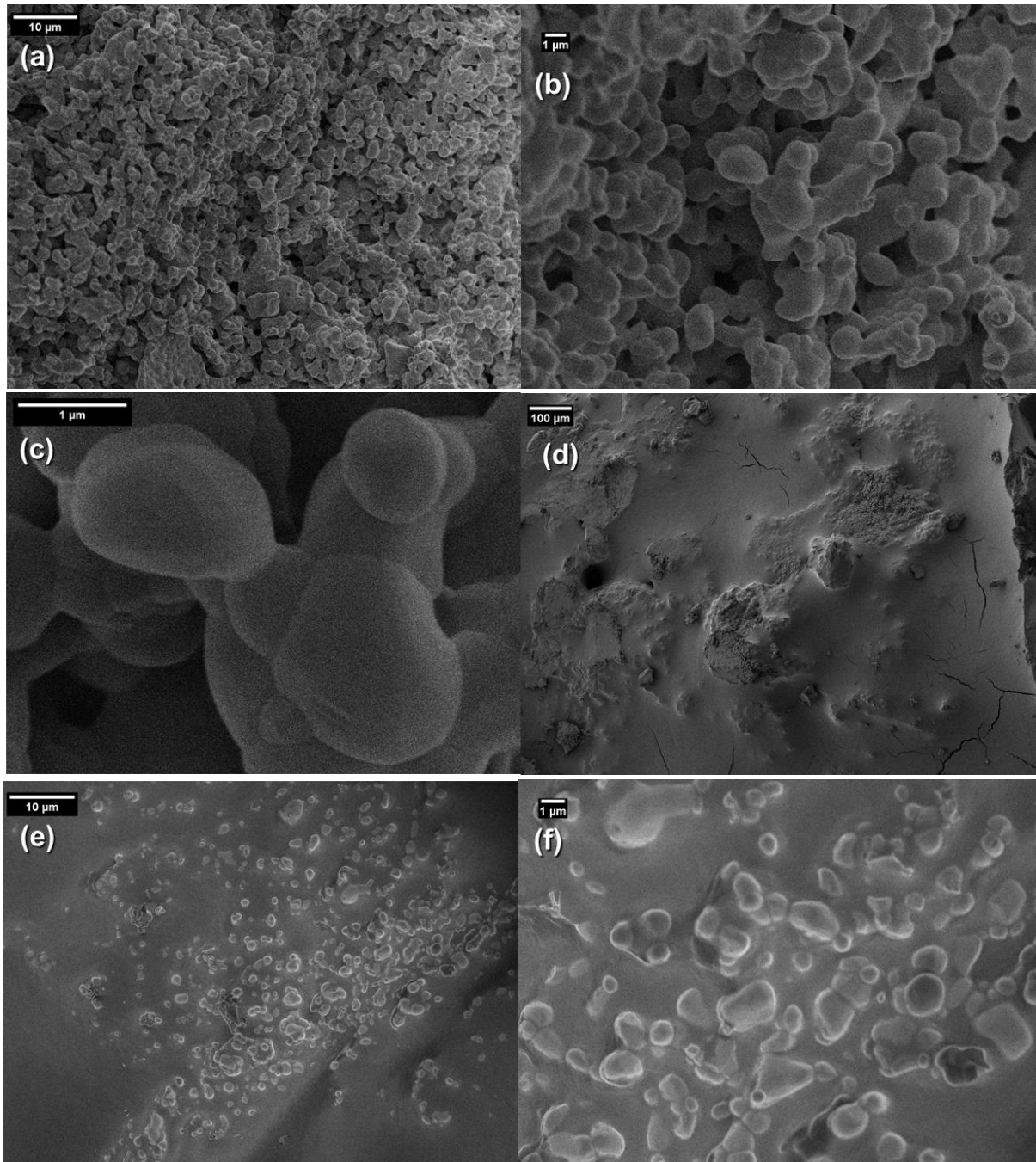
A perda de massa do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic, de aproximadamente 43%, corresponde na sua totalidade a massa do copolímero, uma vez que o grão não apresenta perdas de massa. Desta maneira, demonstra-se que compósito é homogêneo e que o material foi preparado nas proporções propostas.

#### 4.1.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A última caracterização realizada nestas amostras foi a microscopia eletrônica de varredura, permitindo a análise de morfologia do grão de  $\beta$ -TCP e do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic. A Figura 20 (a), (b) e (c) corresponde ao grão de  $\beta$ -TCP. Observa-se que o material é poroso, com poros desordenados e superfície rugosa. Já na Figura 20 (d), (e) e (f) observa-se as micrografias do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic, onde é possível identificar a estrutura do grão recoberto com o polímero. Nota-se nesta amostra que a superfície rugosa da cerâmica está recoberta com polímero, tornando a superfície lisa. Porém, ainda é possível identificar a morfologia do grão abaixo da camada de polímero. E verifica-se que o recobrimento é superficial, como proposto no item 4.1.1.3.



**Figura 20** – Micrografias eletrônicas das amostras (a), (b) e (c) grão  $\beta$ -TCP e (d), (e) e (f) Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic.



Fonte: Autora.

#### 4.2. Determinação da Matriz Polimérica

A fim de selecionar matriz polimérica mais adequada para a liberação dos agentes osteogênicos estudados, preparou-se materiais utilizando três Pluronic<sup>®</sup> com cadeias distintas, que foram caracterizados e realizaram-se as curvas de liberação do íon cobalto das matrizes poliméricas.

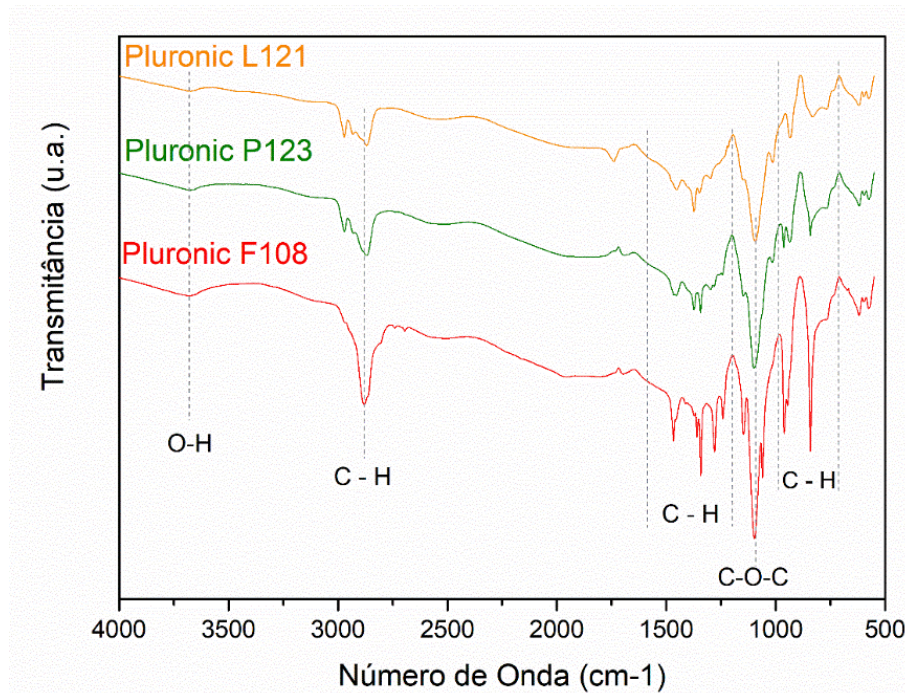
#### 4.2.1. Caracterização da Matriz Polimérica

Os polímeros selecionados para o estudo da matriz polimérica foram caracterizados por FTIR, a fim de verificar suas características. Em seguida realizou-se testes de liberação de cobalto da matriz polimérica.

##### 4.2.1.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho dos três copolímeros estudados estão representados na Figura 21. Pode-se observar que as bandas características de Pluronic®, já descritas no item 4.1.1.2 estão presentes em todas as amostras. Na Tabela 7 são resumidas em todas as atribuições das bandas.

**Figura 21** – Espectro na região do infravermelho das amostras Pluronic® L121, Pluronic® P123 e Pluronic® F108.



**Fonte:** Autora.

Observa-se nos espectros que a banda em  $3677\text{ cm}^{-1}$  nos três polímeros, referente ao grupo hidroxila de álcoois primários, apresentam intensidades diferentes. Isso indica que os polímeros apresentam interações intermoleculares diferentes, logo a quantidade de ligações de hidrogênio em cada cadeia polimérica varia, uma vez que apresentam cadeias formadas com proporções diferentes de poli(óxido de etileno) (PEO) e poli(óxido de propileno) (PPO) <sup>102</sup>.

**Tabela 7** – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.

Amostra	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	
Pluronic®	3677	O-H
	2879	Deformação axial C-H
	~1200-1500	Deformação angular C-H
	1097	Deformação axial C-O-C
	~700-950	Rotação C-H

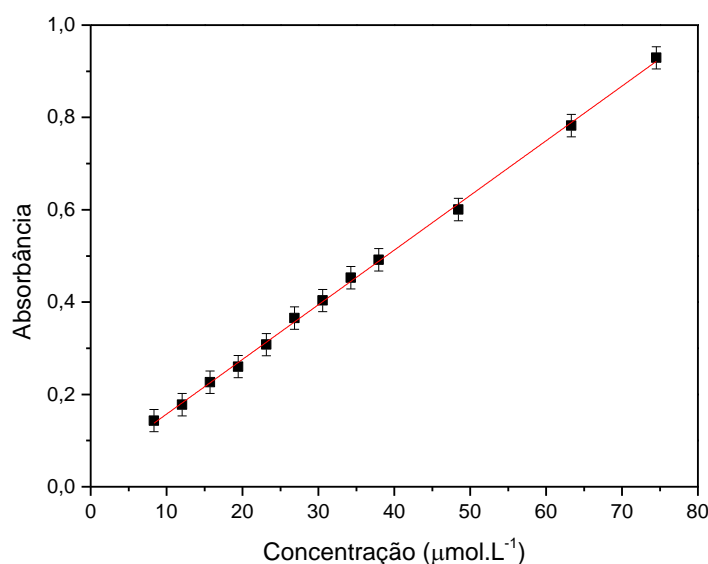
Fonte: Autora.

#### 4.2.2. Curvas de Liberação de íons Cobalto da Matriz Polimérica

Foram realizados testes de liberação de cobalto da matriz polimérica e obteve-se curvas cinéticas de liberação do íon de cada matriz polimérica utilizada, a partir da quantificação das amostras por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, utilizando uma curva de calibração pré-estabelecida.

##### 4.2.2.1. Curva de Calibração

A Figura 22 é a curva obtida a partir da análise em triplicata das concentrações já conhecidas de íons cobalto e dos valores de absorbância correspondente obtidos.

**Figura 22** – Curva de calibração para determinação de íons cobalto.

Fonte: Autora.

O gráfico foi linearizado, obtendo-se um valor R<sup>2</sup> igual a 0,999 e a seguinte equação da reta:  $y = 0,012x + 0,039$ , utilizada para o cálculo da concentração de íons cobalto liberados,

segundo a lei de Lambert-Beer das amostras dos três Pluronic® contendo cobalto, nomeadas como F108Co, P123Co e L121Co, em cada uma das amostragens feitas das curvas de liberação.

#### 4.2.2.2. Curva de Liberação de Íons Cobalto da Matriz Polimérica

Diversas alíquotas foram retiradas durante sete dias, em períodos pré-determinados, das três amostras que permaneceram incubadas. As curvas de liberação das amostras F108Co, P123Co e L121Co são apresentadas na Figura 23.

Para o cálculo da porcentagem de liberação de  $\text{Co}^{2+}$  seguiu-se a metodologia e equação apresentada por Deng et al. (2014), indicada na Equação 1. Neste cálculo é considerada a diluição consequente da reposição de tampão fosfato feita após a retirada de cada uma das alíquotas utilizadas para quantificar íons em solução <sup>109</sup>.

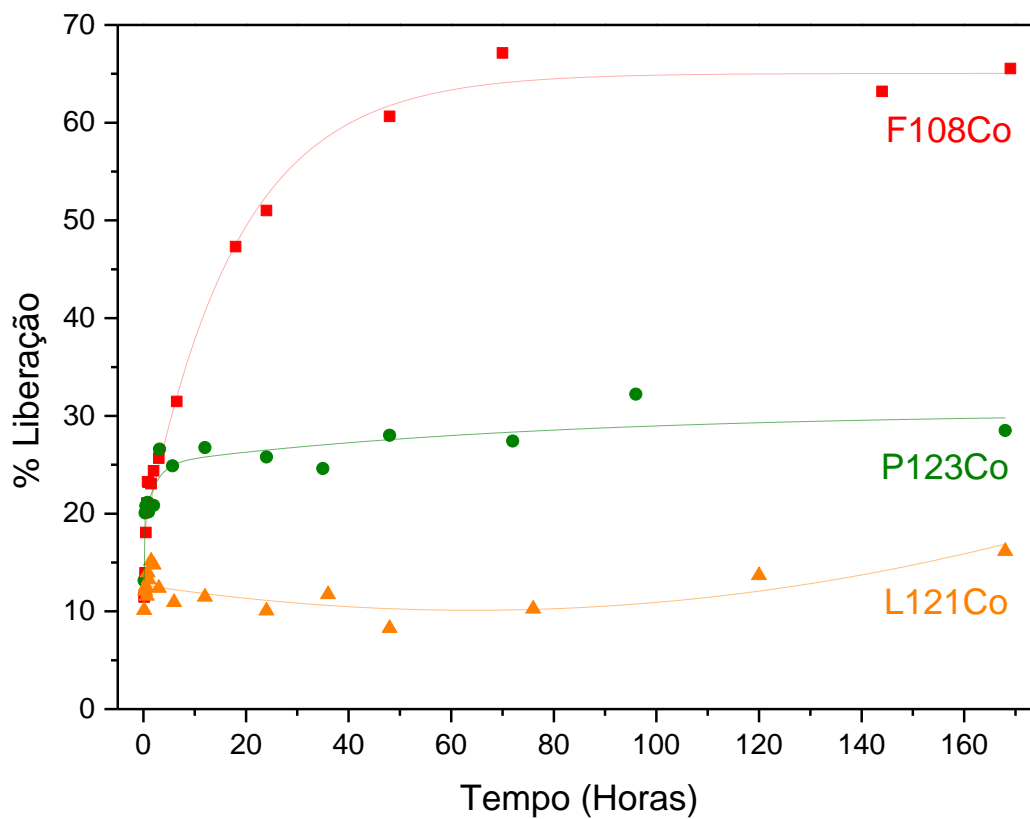
$$\text{Liberação (\%)} = \frac{V_t \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_{\text{Co}^{2+}}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde  $m_{\text{Co}^{2+}}$  é a massa de íons cobaltos presentes na matriz polimérica,  $V_0$  é o volume total da liberação ( $V_0 = 8$  mL),  $V_t$  é o volume de cada alíquota removida no tempo  $t$  ( $V_t = 0,2$  mL),  $C_n$  é a concentração de  $\text{Co}^{2+}$  encontrada na alíquota na última alíquota retirada e  $C_i$  é a concentração de  $\text{Co}^{2+}$  encontrada em cada alíquota anterior.

Nota-se, na Figura 23, que nas três amostras a liberação de íons  $\text{Co}^{2+}$  apresenta características distintas em relação a velocidade de liberação e a porcentagem máxima liberada. Tais perfis podem ser explicados analisando-se o caráter hidrofóbico de cada polímero utilizado. A amostra F108Co liberou uma maior quantidade de íons, permanecendo constante em 70% e atingiu o máximo de liberação depois de 70 horas. A amostra P123Co manteve uma liberação constante de íons em 30% em relação a quantidade inicial, e atingiu o máximo de liberação depois de 12 horas. E a amostra L121Co apresentou a liberação mais rápida, atingindo o patamar máximo depois de 2 horas, porém liberou uma quantidade muito menor de íons, apenas 15% de íons cobalto.

Após o período de sete dias, constatou-se diferenças nos aspectos físicos de cada amostra. A amostra L121Co ainda apresentava a estrutura da matriz polimérica insolúvel no interior da membrana de diálise. Já a matriz polimérica da amostra P123Co havia solubilizado parcialmente, enquanto a matriz da amostra F108Co dissolveu-se quase por completo.

**Figura 23** – Curva de liberação de íons cobalto das amostras F108Co, P123Co e L121Co.



**Fonte:** Autora.

A matriz polimérica, utilizada como plataforma de liberação do fármaco, influencia a velocidade de liberação conforme a sua hidrofiliicidade. Polímero com mais cadeias hidrofílicas, no caso o Pluronic<sup>®</sup> F108, apresentará uma liberação de  $\text{Co}^{2+}$  mais rápida em comparação ao Pluronic<sup>®</sup> P123 e ao Pluronic<sup>®</sup> L121, que possuem menores valores de HLB (Tabela 3), logo são mais hidrofóbicos<sup>110</sup>. Analisando a composição de cada cadeia polimérica, verifica-se uma relação direta entre a quantidade de cadeias hidrofóbicas no polímero e quantidade de íons liberada, ou seja, quanto mais hidrofóbica é a cadeia do copolímero, menos íons são liberados da amostra. Isso ocorre, pois, os polímeros hidrofóbicos apresentam uma menor quantidade de unidades hidrofílicas (PEO) em sua cadeia, logo têm uma interação menor com a água, dificultando a solubilização da cadeia polimérica, e conseqüentemente, a dissolução de  $\text{Co}^{2+}$  em solução. As matrizes poliméricas com cadeias mais hidrofóbicas (L121Co e P123Co) foram praticamente insolúveis na solução tampão. Então, a porcentagem de íons liberados nestes casos, correspondem aos íons presentes na superfície da amostra (polímero+ $\text{CoCl}_2$ ), em contato direto com a solução tampão, ou dispersas próximas a cadeias PEO superficiais, que foram hidrolisadas mais rapidamente. Ao solubilizar a camada superficial e liberar os íons presentes

nesta camada, apenas cadeias hidrofóbicas (PPO) dos polímeros permanecem expostas na superfície e em contato com a solução tampão. O material torna-se insolúvel e impossibilitando a hidrólise do copolímero e a dissolução de cobalto. Já para a amostra F108Co, o polímero é composto em sua maioria por cadeias hidrofílicas (PEO), logo hidrolisa mais rapidamente, justificando assim a maior porcentagem de íons liberada.

Os processos de liberação controlada por parte da matriz polimérica diferem conforme a hidrofiliabilidade da cadeia, o que justifica perfis de liberação variados entre as três amostras. A liberação para cadeias hidrofóbicas ocorre pelo processo de erosão superficial, enquanto para polímeros com equilíbrio de cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas, a ocorre a degradação interna do sistema polimérico <sup>111</sup>.

A partir dos resultados apresentados determinou-se que a amostra F108Co adequou-se melhor à proposta, pois uma maior porcentagem de íons é liberada em um período é importante para reconstituição óssea. Fraturas ósseas inicialmente passam por um processo inflamatório que pode durar até uma semana, seguida da formação do calo ósseo, que posteriormente é substituída por tecido ósseo (Figura 3) <sup>112</sup>. Neste período, células osteogênicas são direcionadas ao local da fratura, portanto, este é o período onde os agentes osteogênicos devem atuar mais acentuadamente.

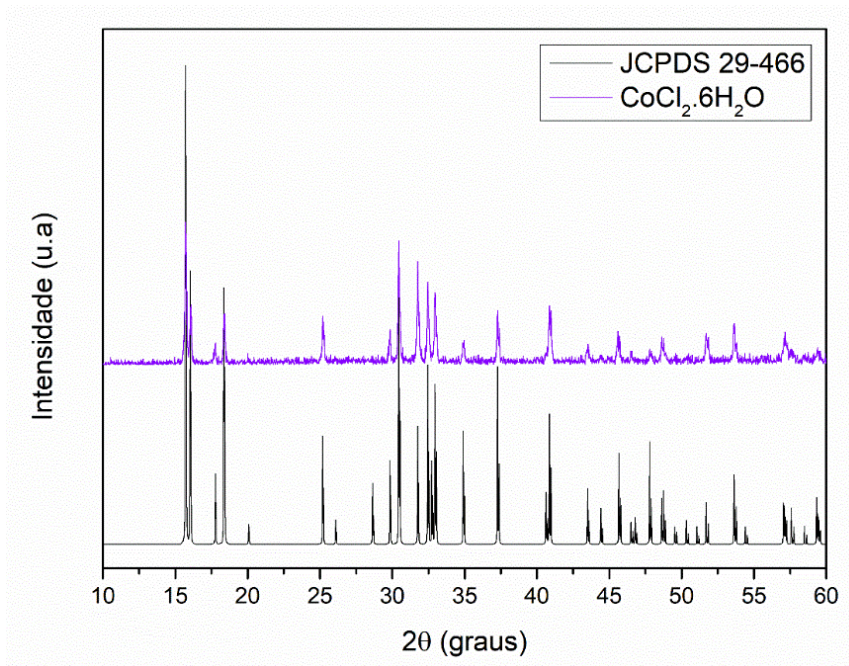
#### **4.2.3. Caracterização da Matriz Polimérica com Íons Cobalto Incorporados**

Após selecionar a matriz polimérica mais adequada para a liberação controlada de cobalto, a amostra foi caracterizada por DRX, DSC e MEV, e comparada com análises de cloreto de cobalto hexahidratado e copolímero puro.

##### **4.2.3.1. Difractometria de Raios X (DRX)**

A matriz polimérica selecionada, contendo íons cobalto incorporados, foi analisada por difratometria de raios X. Primeiramente, analisou-se o difratograma do cloreto de cobalto e identificou-se os principais picos característicos ao comparar-se com o padrão obtido no banco de dados de estrutura cristalina (JCPDS 29-466). Difractogramas são apresentados na Figura 24.

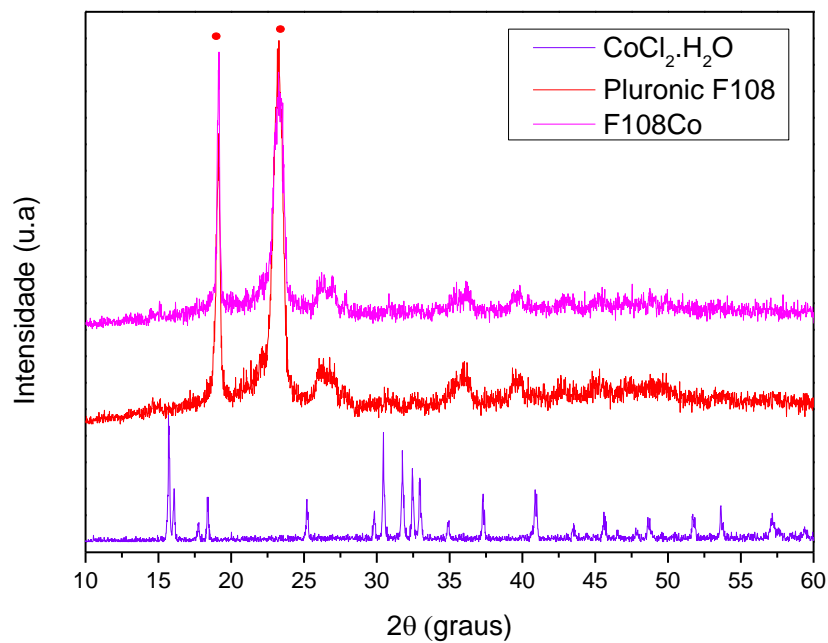
**Figura 24** – Difratoograma de raios X de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e do padrão de difração de raios X de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (JCPDS 29-466).



**Fonte:** Autora.

Em seguida, são apresentados os difratogramas do Pluronic<sup>®</sup> F108 puro, cloreto de cobalto e da matriz polimérica, na Figura 25.

**Figura 25** – Difratoograma de raios X das amostras  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic<sup>®</sup> F108 e F108Co.



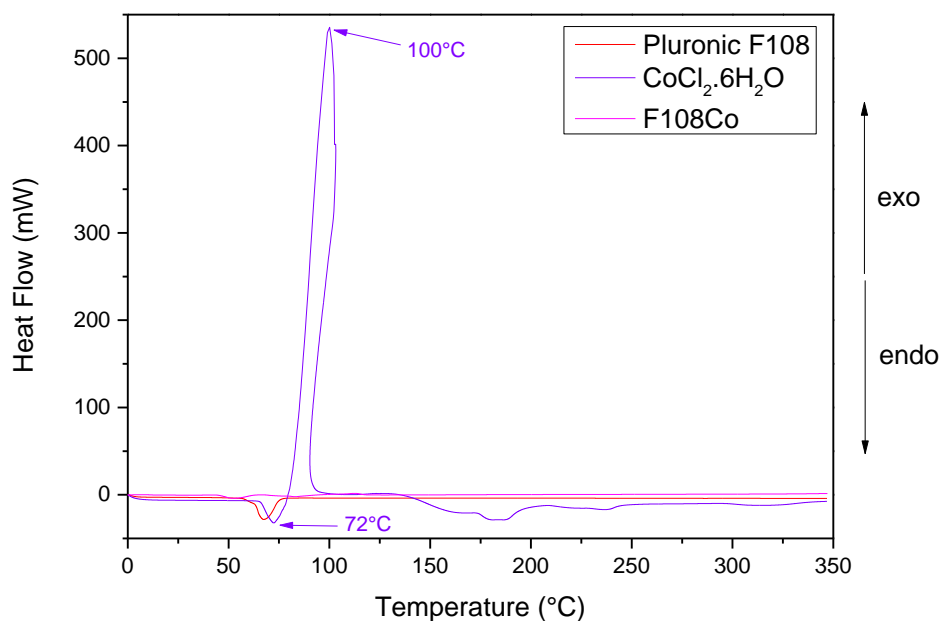
**Fonte:** Autora.

Comparando os difratogramas, verifica-se que os picos  $19,12$  e  $23,26^\circ 2\theta$  característicos do Pluronic<sup>®</sup> F108 estão presentes, indicados com círculos vermelhos, comprovando a origem da matriz polimérica. Porém, não é possível identificar a presença de cobalto por DRX, pois este não apresenta formação cristalina. Assim, a caracterização completa do material será realizada com técnicas complementares, como a calorimetria exploratória diferencial (DSC).

#### 4.2.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na Figura 26 são apresentados os termogramas do Pluronic<sup>®</sup> F108, do cloreto de cobalto e da matriz polimérica F108Co. Inicialmente, foi analisado o termograma do cloreto de cobalto e identificou-se dois eventos, um endotérmico a  $72^\circ\text{C}$  seguido de um exotérmico em  $100^\circ\text{C}$ . São eventos característicos compostos hidratados, que correspondem a desidratação seguida de recristalização. O pico endotérmico ( $72^\circ\text{C}$ ), corresponde a perda de parte das águas de hidratação presentes na estrutura cristalina do cobalto, após a fusão. Este acontecimento é seguido de um evento exotérmico ( $100^\circ\text{C}$ ), resultado da transição de fase do cobalto, que quando hidratado encontra-se em geometria octaédrica e passando para geometria hexagonal, forma mais estável após a perda de águas da sua estrutura. Observa-se um alargamento do pico com máximo em  $100^\circ\text{C}$ , que indica a entalpia de quebra de ligações e mudança de fase do cobalto <sup>113</sup>.

**Figura 26** – Curvas de DSC das amostras  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic<sup>®</sup> F108 e F108Co.

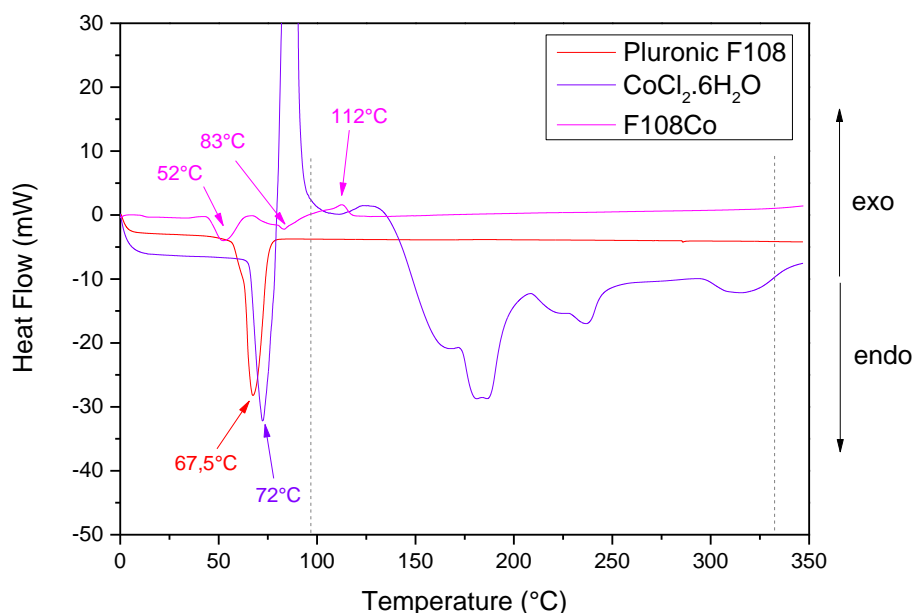


**Fonte:** Autora.



Para identificação dos demais eventos térmicos das amostras, a Figura 27 é apresentada em uma faixa restrita de fluxo de calor (de -50 à 30mW).

**Figura 27** – Curvas de DSC das amostras  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic® F108 e F108Co na faixa de -50mW a 30mW.



**Fonte:** Autora.

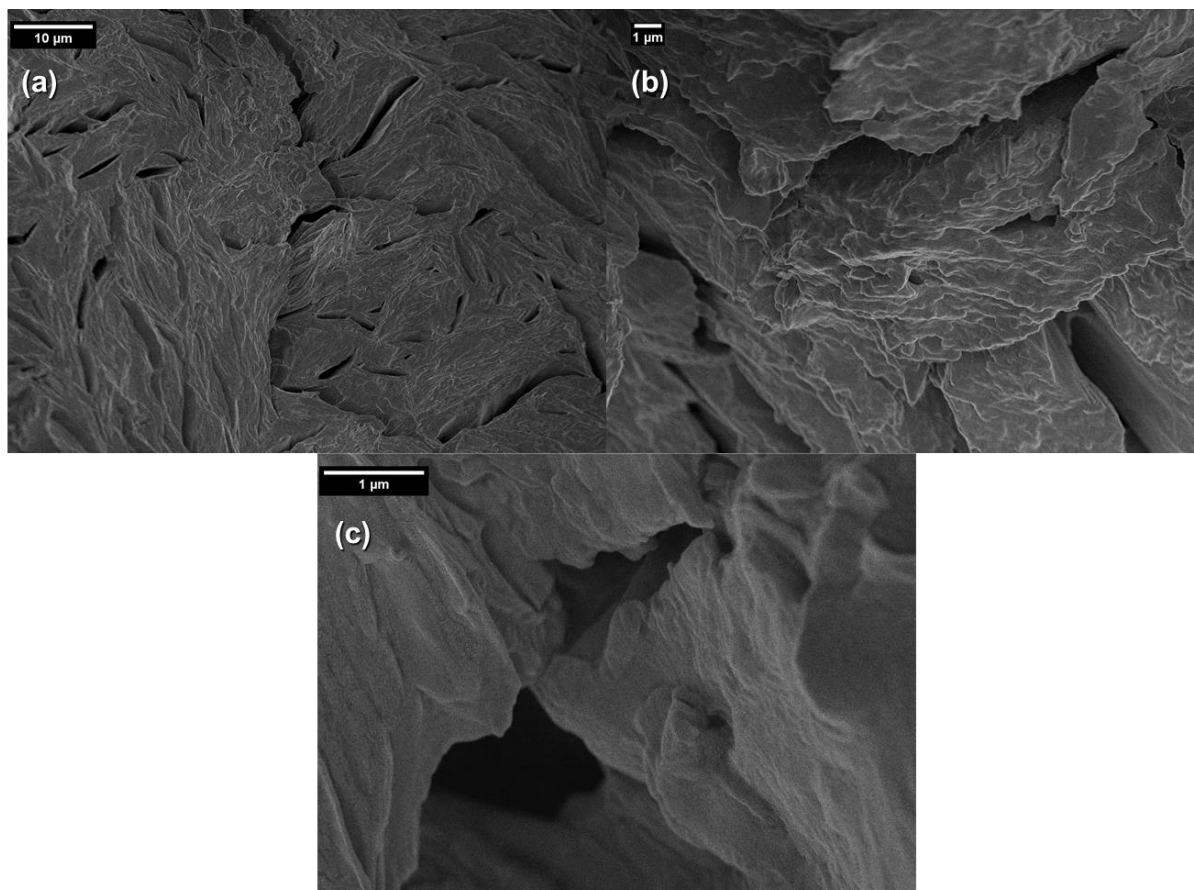
Os eventos térmicos do termograma do  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , na região de 90°C à 330°C, são referentes à perda das demais moléculas de águas de hidratação restando ao final apenas  $\text{CoCl}_2$ <sup>114,155</sup>. Na amostra de Pluronic® identifica-se apenas um evento térmico correspondente a sua fusão (ver item 4.1.1.3). E o terceiro termograma, da matriz polimérica com cloreto cobalto incorporado, apresenta dois eventos endotérmicos em 52°C e 83°C e um evento exotérmico em 112°C. A característica higroscópica do polímero causa a absorção de águas de hidratação do cloreto de cobalto e, conseqüentemente, pode substituir as águas na estrutura do cobalto, justificando a temperatura de fusão do polímero diminuir para 52°C. Este evento indica uma interação do polímero com o cloreto de cobalto. O evento a 83°C corresponde a perda de água de hidratação, uma vez que apresenta características semelhantes aos eventos de desidratação do cloreto de cobalto. E em 112°C ocorre a o rearranjo da estrutura ou transição de fase do cobalto após a perda de águas da sua estrutura.

#### 4.2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 28 são apresentadas as micrografias da amostra F108Co, onde é possível analisar sua morfologia. Observa-se um material homogêneo, resultado da adição de cloreto de

cobalto à matriz polimérica fundida. Assim, considera-se que a incorporação foi eficaz utilizando o método de dispersão sólida, uma vez que não é possível identificar nenhum material aglomerado ou separação de fase entre os componentes da amostra.

**Figura 28** – Micrografias eletrônicas de alta resolução da amostra (a), (b) e (c) F108Co.



Fonte: Autora.

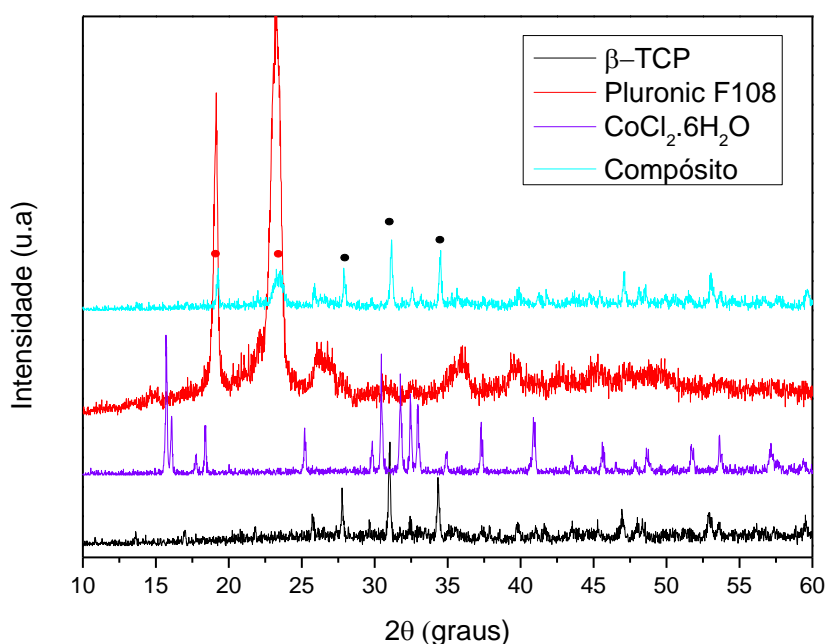
### 4.3. Caracterização do Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto

O compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto foi caracterizado por DRX, DSC, TGA e MEV, a fim de confirmar a presença de  $\beta$ -TCP do polímero e cobalto no compósito preparado.

#### 4.3.1. Difractometria de Raios X (DRX)

Na Figura 29 é apresentado o difratograma de raios X da amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto, assim como das amostras de grão de  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108 e  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  separadamente para comparação.

**Figura 29** – Difratoograma de raios X das amostras de grão  $\beta$ -TCP,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic<sup>®</sup> F108 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto.



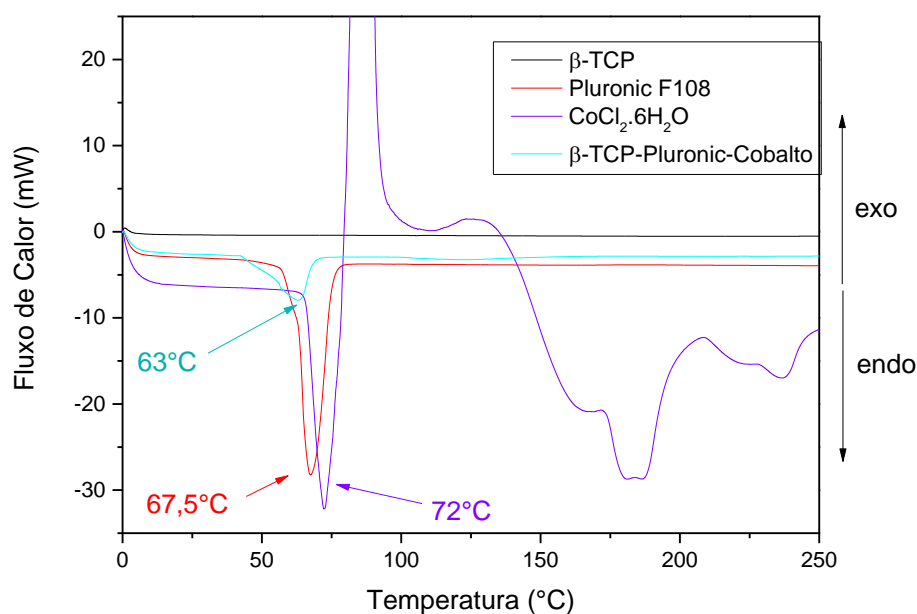
**Fonte:** Autora.

Observa-se que o material composto apresenta os picos característicos do  $\beta$ -TCP, em  $27,81$ ,  $31,05$  e  $34,39^\circ$   $2\theta$ , indicados com círculos pretos, e os picos  $19,12$  e  $23,26^\circ$   $2\theta$ , indicados com círculos vermelhos, característicos do Pluronic<sup>®</sup> F108. Assim, determinou-se a presença de  $\beta$ -TCP e polímero no material, enquanto cobalto foram determinados por meio de outras técnicas e na quantificação dos íons cobalto feita nos testes de liberação.

#### 4.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 30 apresenta o termograma do composto  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto com uma aproximação no fluxo de calor (na faixa de  $-50$  mW a  $30$  mW) para melhor analisar os eventos térmicos que ocorreram na faixa de temperatura de  $0^\circ\text{C}$  a  $250^\circ\text{C}$ , uma vez que o termograma do cloreto de cobalto já foi analisado no item 4.2.3.2.

**Figura 30** – Curvas de DSC das amostras de grão  $\beta$ -TCP,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Pluronic® F108 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto na faixa de -50mW a 30mW.



**Fonte:** Autora.

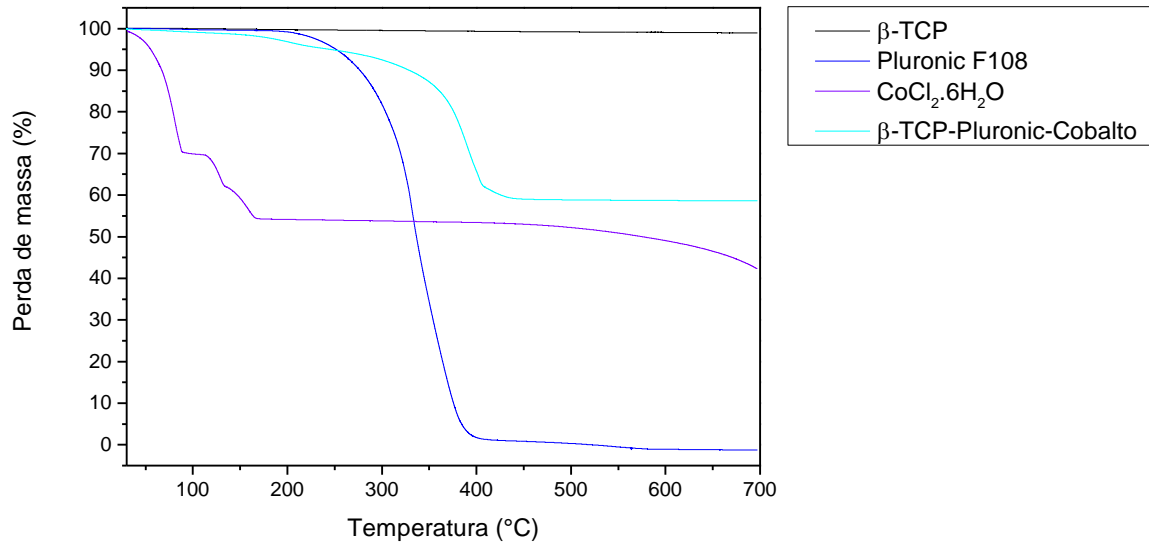
O compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto apresenta apenas um evento térmico em  $63,0^\circ\text{C}$  que corresponde a fusão do polímero. Novamente observa-se uma alteração na temperatura deste evento, quando comparado a temperatura de fusão do polímero da amostra de Pluronic® F108. Retomando os itens 4.1.1.3 e 4.2.3.2, justifica-se a variação na temperatura de fusão do polímero primeiramente devido a interação polímero-cobalto. Além disso, a matriz polimérica apenas recobre a superfície do grão, apresentando superfície de contato maior, logo a difusão de calor ocorre mais rapidamente. O termograma do compósito não apresenta nenhum sinal de desidratação, como esperado, uma vez que todas as águas presentes na estrutura do cloreto de cobalto hexahidratado foram perdidas no preparo do material. Além disso, nota-se que o calor absorvido no processo de fusão do material compósito é menor quando comparado com o polímero puro. Isto ocorre, pois, o polímero representa apenas 50% do material total, indicando que o compósito foi preparado na proporção esperada.

#### 4.3.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

Na Figura 31 é apresentada a curvas termogravimétrica da amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto, assim como das amostras de grão de  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108 e  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , separadamente, para fins de comparação. A análise da perda de massa desta amostra com a

variação de temperatura foi realizada a fim de estimar a quantidade de polímero que compõe o compósito.

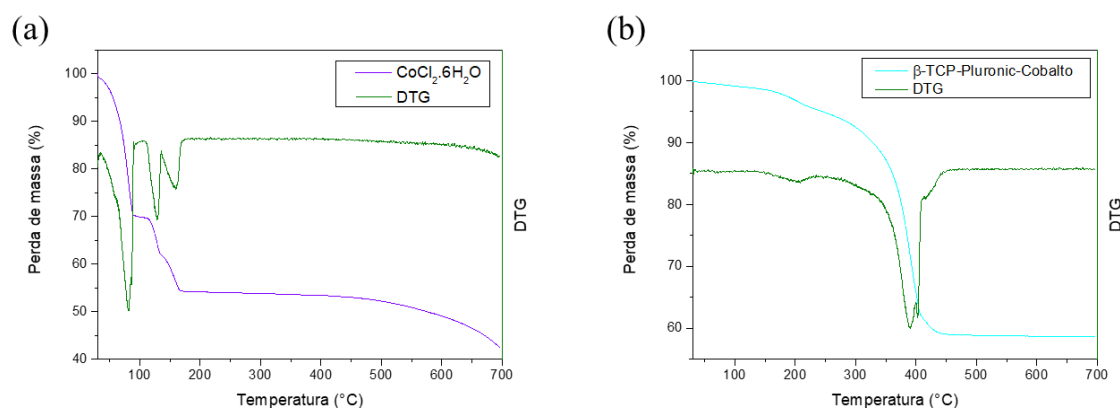
**Figura 31** – Curvas de TG das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto.



**Fonte:** Autora.

As curvas TG-DTG das amostras  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto são apresentadas nas Figuras 32 (a) e (b), respectivamente. Pode-se verificar que as perdas de massa da amostra de cloreto de cobalto hexahidratado não estão presentes na amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto, uma vez que todas as águas de hidratação são perdidas no processo de preparo do material compósito. O copolímero apresentou duas perdas de massa, com uma perda total de aproximadamente 42%. A primeira perda de massa de 4%, em 210 °C é atribuída a água absorvida no compósito. A segunda perda de massa de aproximadamente 40%, ocorre na faixa de temperatura de 235 °C a 450 °C, e corresponde a degradação do copolímero. Esta perda também ocorreu em duas etapas, assim como ocorreu com a degradação polímero quando analisado separadamente. Nota-se, também, que há um aumento na temperatura de decomposição do polímero presente no compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto, quando comparada a temperatura de decomposição do Pluronic® F-108, devido a interação polímero-cobalto, como identificado na análise por DSC (item 4.3.2).

**Figura 32** – Curvas de TG-DTG das amostras (a)  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e (b) Composito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto.



**Fonte:** Autora.

Analisando as perdas de massas da amostra  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , determina-se três perdas de massas simultâneas, referente às perdas das águas de hidratação. Entre 40 °C e 90 °C ocorre a perda de 30%, referente a quatro moléculas de água presentes na estrutura do cloreto de cobalto. Em seguida, uma molécula de água é perdida entre 107 °C e 135 °C, e por fim ocorre a perda de mais uma de água entre as temperaturas 135 °C e 170 °C <sup>116</sup>. As perdas de massas referentes à análise do  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  são resumidas na Tabela 8. A partir de 600 °C, observa-se o início da decomposição de cloreto de cobalto em óxido de cobalto, que segundo a literatura ocorre em faixas de 600 °C a 850 °C, não sendo possível analisa-la neste caso <sup>116</sup>.

**Tabela 8** – Reação proposta para a desidratação de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e perdas de massas calculadas.

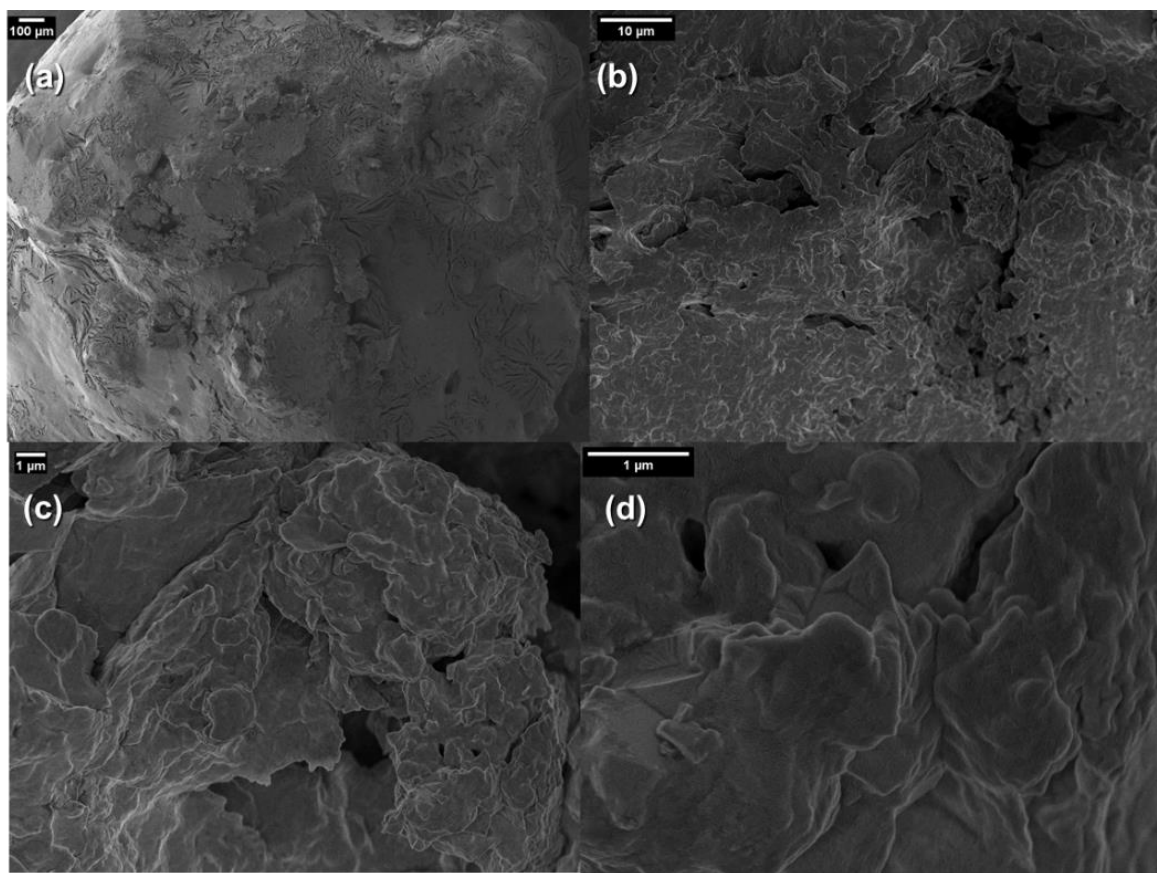
Etapa	Temperatura (°C)	Etapa de Reação Proposta	Perda de Massa Cumulativa (%)
1	80	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}_2\text{O}$	30
2	130	$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	38
3	160	$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CoCl}_2 + \text{H}_2\text{O}$	46

**Fonte:** Autora.

#### 4.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Por fim, o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura, permitindo a análise da morfologia. As micrografias são apresentadas na Figura 33.

**Figura 33** – Micrografias eletrônicas de alta resolução da amostra (a), (b), (c) e (d)  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto.



**Fonte:** Autora.

Na Figura 33 (a) é apresentado o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto com uma aproximação de 50 vezes, e observa-se o formato arredondado do grão, as características de recobrimento e secagem do polímero sobre o grão. A distribuição do polímero na superfície do grão apresenta-se de maneira irregular, com estrutura composta de rachaduras, regiões com maior aglomeração de polímero e regiões com camadas menos espessas de polímero. Nas demais micrografias, Figuras 33 (b), (c) e (d), observa-se maiores detalhes do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto. Este compósito apresenta morfologia semelhante ao do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic, como apresentado no item 4.1.1.4 (Figura 20). A superfície do compósito é lisa, devido ao recobrimento superficial de polímero, mas é possível ainda identificar a morfologia rugosa do grão abaixo da camada de polímero.

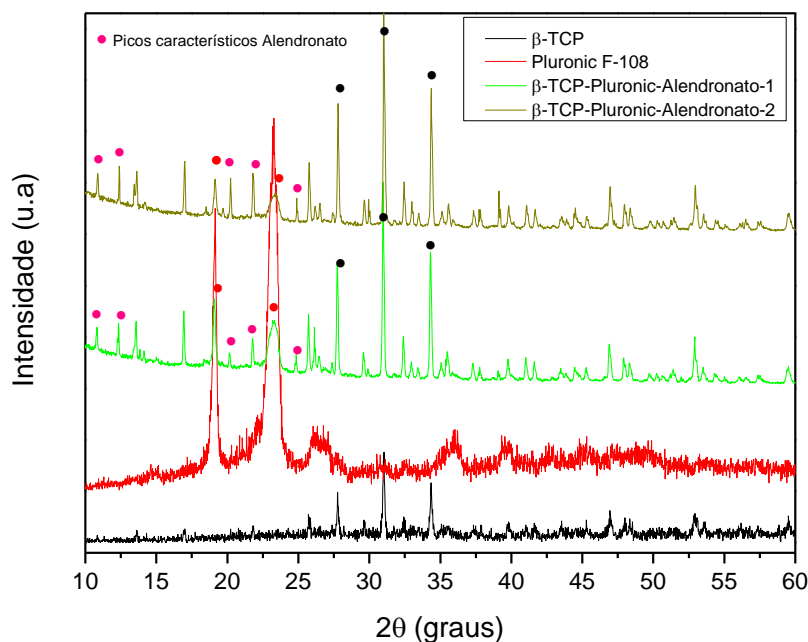
#### **4.4. Caracterização do Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato**

Após o preparo, os compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 foram caracterizados por DRX, FTIR, DSC, TGA e MEV, a fim de confirmar a presença de  $\beta$ -TCP, do polímero e alendronato nas amostras.

#### 4.4.1. Difractometria de Raios X (DRX)

Na Figura 34 são apresentados os difratogramas de raios X das amostras  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 e das amostras de grão de  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108, utilizados na análise de comparação dos resultados.

**Figura 34** – Difratoograma de raios X das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2.



**Fonte:** Autora.

Em ambos os materiais compósitos observa-se os picos de difração de raios X característicos do  $\beta$ -TCP, em  $27,78$ ,  $31,03$  e  $34,35^\circ$   $2\theta$ , indicados com círculos pretos, e os picos  $19,10$  e  $23,30^\circ$   $2\theta$ , característicos do copolímero cristalino Pluronic® F108, indicado com círculos vermelhos. Pode-se notar a variação de intensidade dos picos do copolímero entre as amostras  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2, confirmando a diferença de composição dos compósitos.

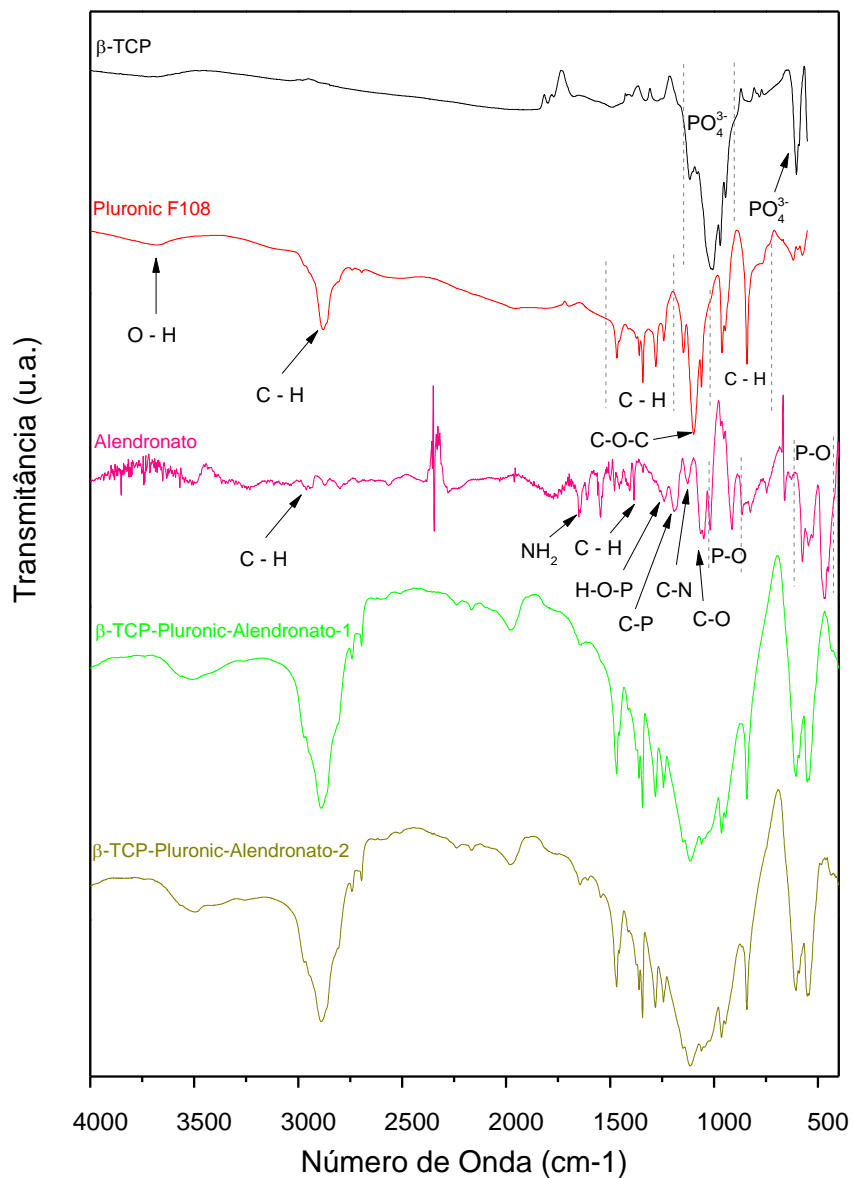
Os círculos em rosa marcados no difratograma, destacam os picos característicos do fármaco, segundo a literatura<sup>78,117</sup>. Observa-se a presença dos picos  $10,77$ ,  $12,36$ ,  $20,12$ ,  $21,73$  e  $24,80^\circ$   $2\theta$ , característico do alendronato, nas amostras  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2. Na amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1, todos os picos do fármaco apresentam-se com intensidade menor, indicando que a relação de concentração alendronato/polímero é menor nesta amostra, confirmando a maior concentração do polímero.



#### 4.4.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Na Figura 35 são apresentados os espectros de espectroscopia vibracional na região do infravermelho para as amostras  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 e das amostras de grão de  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108 e alendronato, para comparação dos resultados.

**Figura 35** – Espectro na região do infravermelho das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108, Alendronato, Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2.



**Fonte:** Autora.

No espectro da amostra alendronato, atribui-se bandas 465, 541, 578, 915 e 1015 cm<sup>-1</sup> aos grupos fosfato (P-O), a banda 1052 cm<sup>-1</sup> a ligação do grupo C-O, a banda em 1645 cm<sup>-1</sup> à

amina primária (NH<sub>2</sub>) e as bandas em 1379 e 2958 cm<sup>-1</sup> ao grupo C-H das cadeias carbônicas. Por fim, a banda 1130 cm<sup>-1</sup> é referente a deformação axial da ligação amina (C-N), a banda 1182 cm<sup>-1</sup> a deformação axial da ligação carbono fosfato (C-P) e a banda em 1243 cm<sup>-1</sup> é atribuída a deformação angular do grupo fosfato (H-O-P) <sup>78,102,117</sup>.

Analisando os espectros dos compósitos β-TCP-Pluronic-Alendronato-1 e β-TCP-Pluronic-Alendronato-2 observa-se a presença de bandas referentes tanto ao β-TCP como Pluronic® F108 e alendronato, indicando assim a presença de todos os materiais no compósito. É possível identificar as bandas mais intensas referentes à vibração do grupo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> em 611 cm<sup>-1</sup> referente ao β-TCP. E a banda em 1098 cm<sup>-1</sup> atribuída a deformação axial C-O-C, as bandas entre 700 e 950 cm<sup>-1</sup> atribuídas às bandas de rotação da ligação C-H, as bandas entre 1200 e 1500 cm<sup>-1</sup> são referentes a deformação angular C-H e em 2891 cm<sup>-1</sup> a deformação axial C-H referentes ao copolímero Pluronic® F108. Devido à maior concentração do polímero, identifica-se apenas a banda 1130 cm<sup>-1</sup> é referente a deformação axial da ligação amina (C-N) nas amostras compósitas, comprovando a presença do fármaco. As atribuições de bandas dos espectros de absorção na região do infravermelho para as três amostras estão resumidas na Tabela 9.

**Tabela 9** – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.

<b>Amostra</b>	<b>Bandas (cm<sup>-1</sup>)</b>	
<b>β-TCP</b>	~900-1200	Estiramento PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	605	Vibração PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
<b>Pluronic® F108</b>	3677	O-H
	2879	Deformação axial C-H
	~1200-1500	Deformação angular C-H
	1097	Deformação axial C-O-C
	~700-950	Rotação C-H
<b>Alendronato</b>	465, 541, 578, 915, 1015	P-O
	1052	C-H
	1645	NH <sub>2</sub>
	1379, 2958	C-H
	1130	Deformação axial C-N
	1182	Deformação axial C-P
	1243	Deformação angular H-O-P

Continuação Tabela 9 – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.

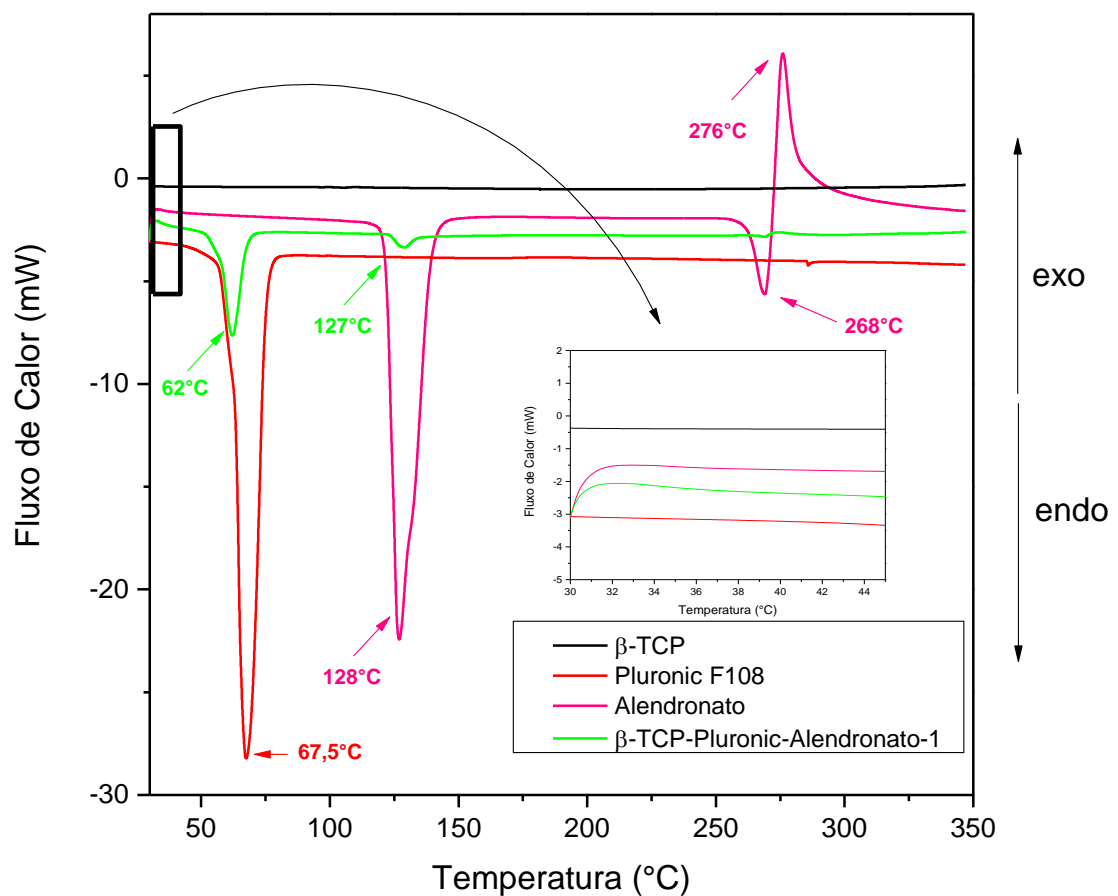
Amostra	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	
	605	Vibração PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
Compósito	289	Deformação axial C-H
<b>β-TCP-Pluronic-Alendronato-1</b>	~1200-1500	Deformação angular C-H
e	1098	Deformação axial C-O-C
<b>β-TCP-Pluronic-Alendronato-2</b>	~700-950	Rotação C-H
	1130	Deformação axial C-N

Fonte: Autora.

#### 4.4.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na Figura 36 são apresentados os termogramas do grão de β-TCP, do polímero Pluronic® F108, alendronato e do compósito β-TCP-Pluronic-Alendronato-1.

Figura 36 – Curvas de DSC das amostras de grão β-TCP, Pluronic® F108, Alendronato e Compósito β-TCP-Pluronic-Alendronato-1.

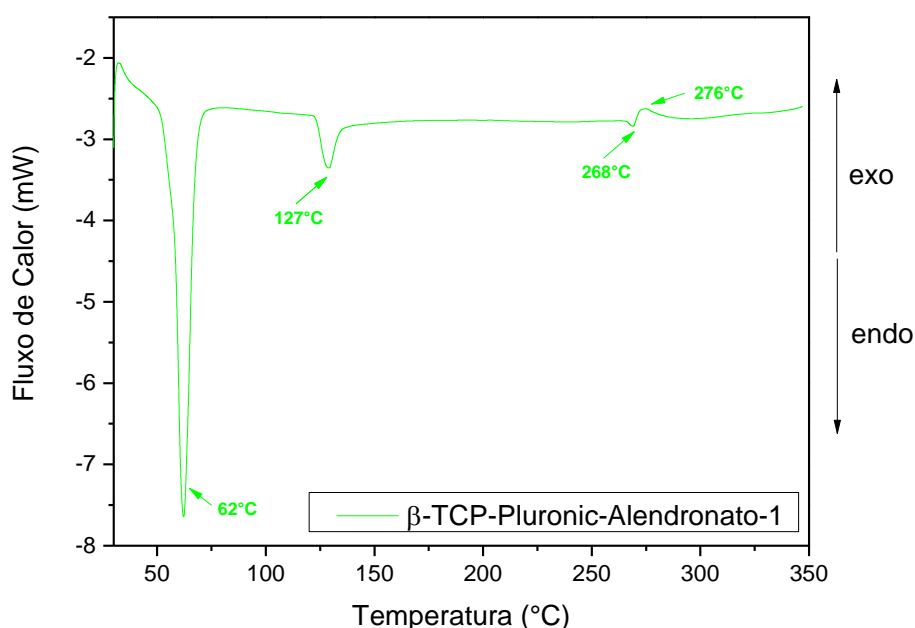


Fonte: Autora.

No termograma do alendronato ocorrem três eventos térmicos principais. Em 131 °C, ocorre o primeiro evento endotérmico, que corresponde a perda de água de hidratação do fármaco trihidratado. O segundo evento em 268 °C, também endotérmico, corresponde ao ponto de fusão do alendronato. E terceiro evento, um evento exotérmico em 276 °C, é referente à decomposição do fármaco <sup>76,118</sup>.

Para análise do termograma do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1, na Figura 37 está apresentando o termograma novamente, em uma faixa mais restrita de fluxo de calor (na faixa de -1 mW a -8 mW). Desta maneira é possível visualizar a ocorrência dos eventos térmicos referente ao polímero e ao fármaco. Observa-se que houve uma diminuição na temperatura de fusão do polímero (62 °C) no compósito, indicando o recobrimento superficial com maior superfície de contato do polímero no grão de  $\beta$ -TCP. Além disso, observa-se os três eventos térmicos do alendronato, comprovando a presença do fármaco na composição do compósito.

**Figura 37** – Curvas de DSC das amostras de  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 na faixa de -3 mW a -8 mW.



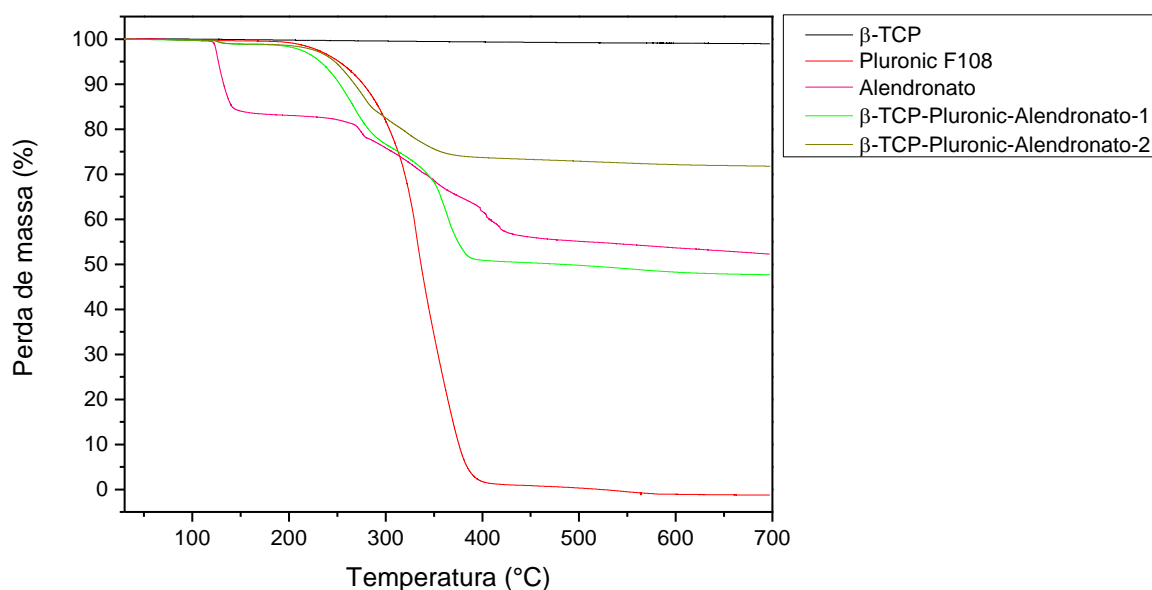
**Fonte:** Autora.

É apresentado na Figura 36 a ampliação dos termogramas entre as temperaturas de 30 e 45°C e confirma-se que não ocorre nenhum evento térmico nesta faixa de temperatura, para o  $\beta$ -TCP e Pluronic® F108, individualmente, assim como para o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1. Conclui-se que o material é estável em 37°C, temperatura que serão realizados os testes de liberação controlada dos agentes osteogênicos, garantindo assim que não haverá degradação ou desestabilização do compósito durante os testes.

#### 4.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

Na Figura 38 são apresentadas as curvas termogravimétricas amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2, e também do grão de  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108 e fármaco alendronato. A análise da perda de massa desta amostra com a variação de temperatura é realizada a fim de estimar a quantidade de polímero que compõe os compósitos.

**Figura 38** – Curvas de TG das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108, Alendronato, Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2.



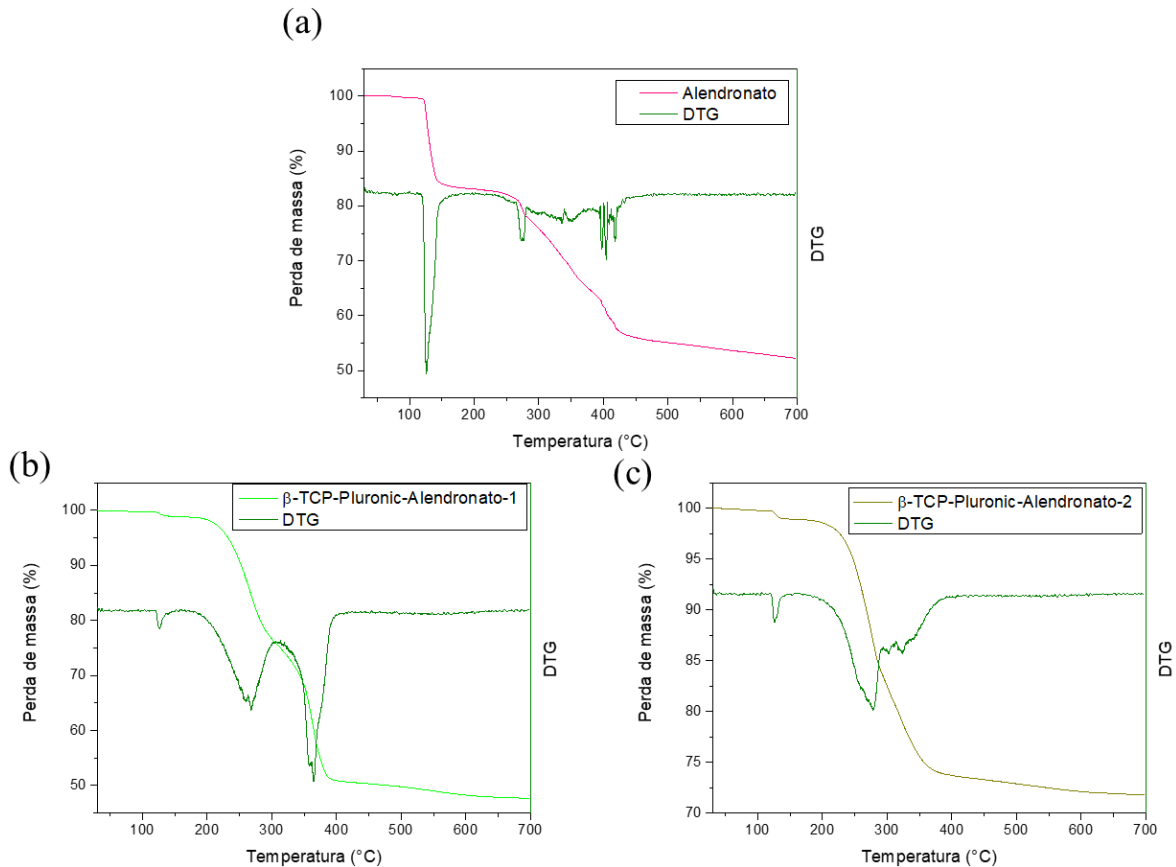
**Fonte:** Autora.

A Figuras 39 (a), (b) e (c) apresentam as curvas TG-DTG das amostras alendronato e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2, respectivamente. O fármaco apresenta três etapas de perda de massa na curva termogravimétrica. A primeira perda de massa de 13%, entre 110 °C e 160 °C, é referente à perda das três moléculas de água de hidratação. Na segunda etapa, entre 230 °C e 300 °C, corresponde a perda de amônia da estrutura, uma perda de massa de 6%. E a terceira etapa corresponde a decomposição do alendronato, a partir de 300 °C. Há uma perda de massa de 22%, obtendo-se pirofosfonato de sódio ( $\text{NaH}_3\text{P}_2\text{O}_7$ ) como produto de degradação <sup>76</sup>.

Ambos os compósitos apresentam uma perda de massa de 1% em 125 °C que é atribuída à água absorvida no compósito. A perda de massa entre 200 °C e 400 °C, é atribuída a decomposição do copolímero. Assim como na análise do copolímero puro (item 4.1.1.4), a degradação ocorre em duas etapas. Para o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1, a perda de massa referente à degradação do polímero foi de 48%, enquanto a perda de massa no

compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 foi de 26%. Isso confirma a composição propostas dos compósitos.

**Figura 39** – Curvas de TG-DTG das amostras (a) alendronato, (b) Composito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e (c) Composito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2.

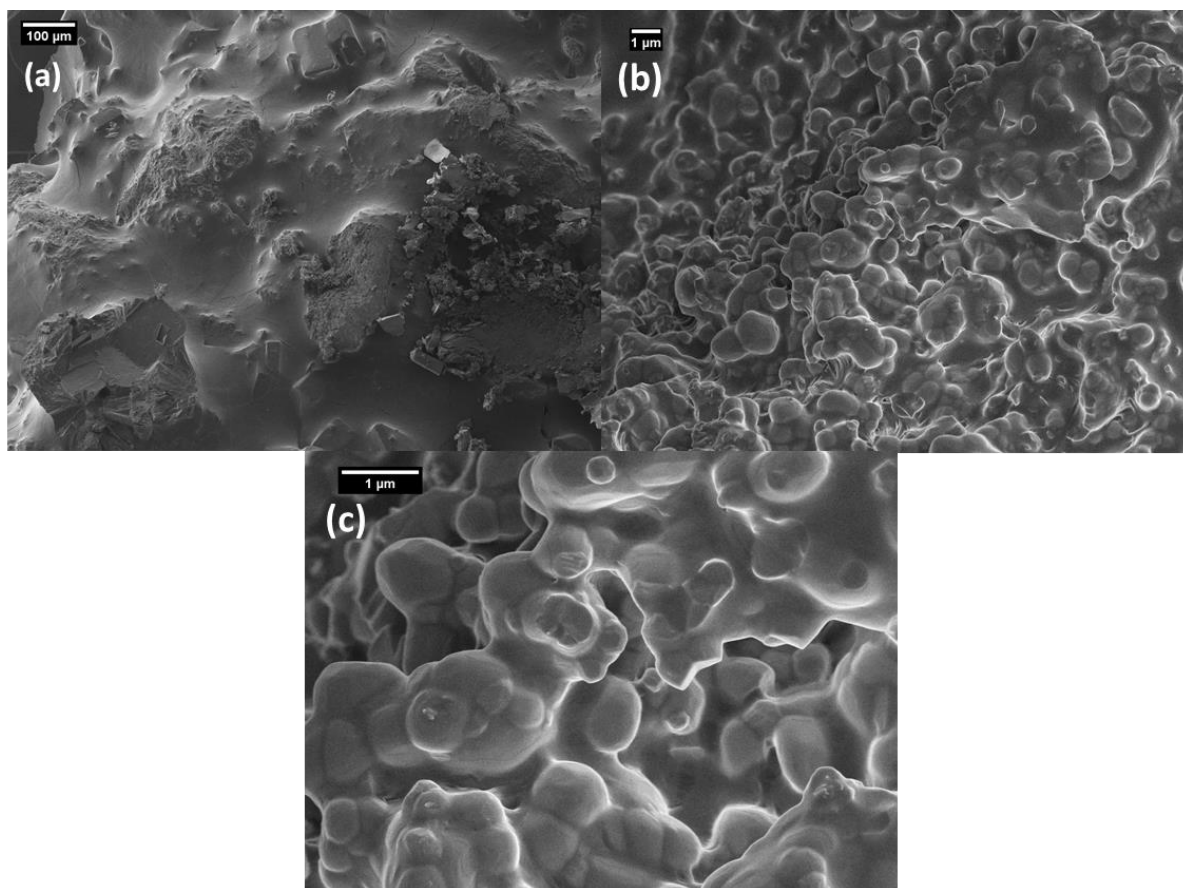


**Fonte:** Autora.

#### 4.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. As micrografias são apresentadas na Figura 40.

**Figura 40** – Micrografias eletrônicas de alta resolução da amostra (a), (b), (c)  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1.



**Fonte:** Autora.

Na Figura 40 (a) é apresentado o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 com uma aproximação de 100 vezes, e observa-se o formato do grão, e o recobrimento do polímero. É possível identificar cristais, com formato retangular, que corresponde ao fármaco alendronato que está presente na camada mais superficial do compósito. Nas demais micrografias, Figuras 40 (b) e (c), verifica-se que a morfologia é semelhante à do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto, a estrutura do grão ainda visíveis sob o recobrimento superficial liso do polímero. A estrutura do grão deve ser mantida, uma vez que é uma característica muito importante para a regeneração óssea, pois que facilita a adesão de células no compósito e a interação entre o compósito e o meio.

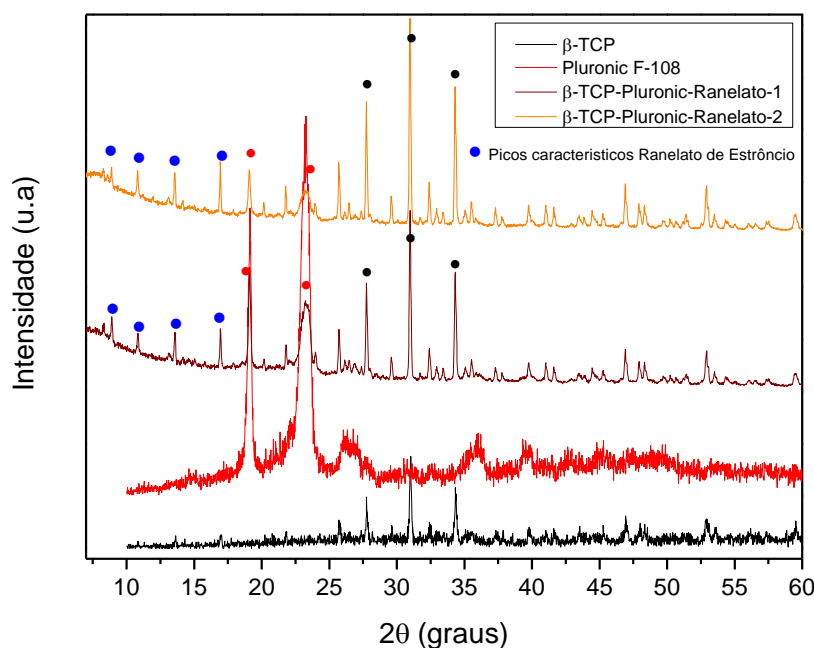
#### **4.5. Caracterização do Compósito $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato**

Os compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 foram caracterizados por DRX, FTIR, DSC, TGA e MEV, a fim de confirmar a composição das amostras.

#### 4.5.1. Difractometria de Raios X (DRX)

Na Figura 41, está apresentado o difratograma de raios X das amostras  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2, grão de  $\beta$ -TCP e Pluronic® F108, analisados para caracterização dos compósitos.

**Figura 41** – Difratograma de raios X das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108 e  $\beta$ -TCP-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2.



**Fonte:** Autora.

Nos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 observa-se os picos de difração de raios X característicos do  $\beta$ -TCP, em 27,74, 30,97 e 34,32° 2 $\theta$ , indicados com círculos pretos e os picos característicos do Pluronic® F108, em 19,08 e 23,23° 2 $\theta$ , indicados com círculos vermelhos.

No difratograma estão indicados com círculos em azul os picos característicos do ranelato de estrôncio, segundo a literatura <sup>119</sup>. Nas duas amostras observa-se a presença dos picos 8,87, 10,81, 13,55 e 16,95° 2 $\theta$ , característico do ranelato de estrôncio.

Assim como na caracterização dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 (descrito no item 4.4.1), há uma variação na intensidade dos picos de polímero e fármaco entre as duas amostras,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2. Os picos de polímero apresentam mais intensidade, enquanto os picos de fármaco apresentam-se menos intensos na amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1, devido a maior concentração de polímero na sua composição.



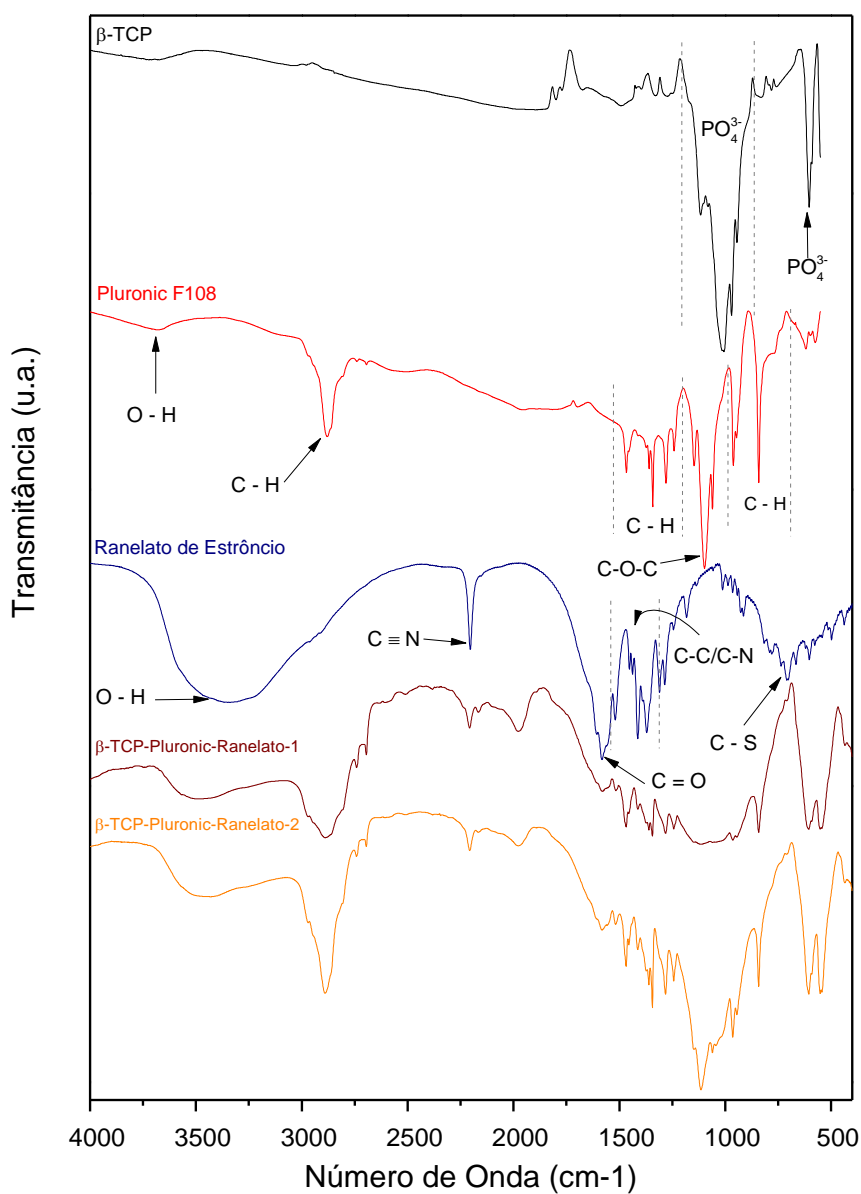
#### 4.5.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de grão de  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108, ranelato de estrôncio e dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 são apresentados na Figura 42.

No espectro referente ao fármaco ranelato de estrôncio, atribui-se bandas  $700\text{ cm}^{-1}$  à ligação carbono enxofre (C-S), a banda  $1581\text{ cm}^{-1}$  à vibração da ligação C=O característico de sais carboxilatos, as bandas na região de  $1400$  à  $1600\text{ cm}^{-1}$  à ligações C-C e C-N, o pico em  $2200\text{ cm}^{-1}$  à ligação C $\equiv$ N e a banda na região de  $3000$  à  $3500\text{ cm}^{-1}$  à ligação O-H<sup>119-121</sup>.

Nos espectros de cada um dos compósitos ( $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2) identifica a presença das bandas características do  $\beta$ -TCP como do Pluronic® F108 e do ranelato de estrôncio, indicando assim a composição do compósito. Identifica-se as bandas de vibração do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  em  $605\text{ cm}^{-1}$  referente ao  $\beta$ -TCP. Verifica-se também a banda em  $1112\text{ cm}^{-1}$  atribuída a deformação axial C-O-C, as bandas entre  $700$  e  $950\text{ cm}^{-1}$  atribui-se as bandas a rotação da ligação C-H, as bandas entre  $1200$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  referentes a deformação angular C-H e a banda em  $2883\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a deformação axial C-H referentes ao copolímero Pluronic® F108. Identificou-se nos compósitos as bandas  $1581\text{ cm}^{-1}$  de vibração da ligação C=O e a banda em  $2200\text{ cm}^{-1}$  referente a ligação C $\equiv$ N, bandas características do fármaco. Na Tabela 10 são resumidas as atribuições de bandas dos espectros de absorção na região do infravermelho para as três amostras.

**Figura 42** – Espectro na região do infravermelho das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108, Ranelato de Estrôncio, Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e Compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2.



Fonte: Autora.

**Tabela 10** – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.

Amostra	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	
$\beta$ -TCP	~900-1200	Estiramento PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	605	Vibração PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
Pluronic® F108	3677	O-H
	2879	Deformação axial C-H
	~1200-1500	Deformação angular C-H
	1097	Deformação axial C-O-C
	~700-950	Rotação C-H

**Continuação Tabela 10** – Lista das principais atribuições identificadas nos espectros de absorção na região do infravermelho.

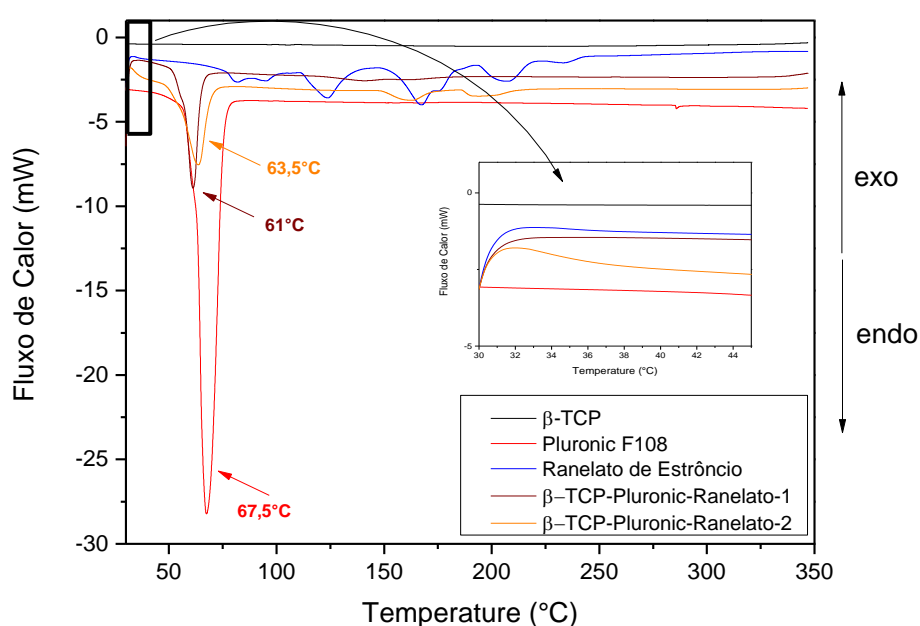
Amostra	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	
Ranelato de Estrôncio	700	C-S
	1581	Vibração C=O
	~1400-1600	C-C/C-N
	2200	C≡N
	~3000-3500	O-H
Compósito β-TCP-Pluronic-Ranelato-1 e β-TCP-Pluronic-Ranelato-2	605	Vibração PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	289	Deformação axial C-H
	~1200-1500	Deformação angular C-H
	1098	Deformação axial C-O-C
	2203	C≡N
	1588	Vibração C=O

Fonte: Autora.

#### 4.5.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na Figura 43 são apresentados os termogramas do grão de β-TCP, do polímero Pluronic<sup>®</sup> F108, ranelato de estrôncio e do compósito β-TCP-Pluronic-Ranelato-1 e β-TCP-Pluronic-Ranelato-2.

**Figura 43** – Curvas de DSC das amostras de grão β-TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108, ranelato de estrôncio, compósito β-TCP-Pluronic-Ranelato-1 e compósito β-TCP-Pluronic-Ranelato-2.



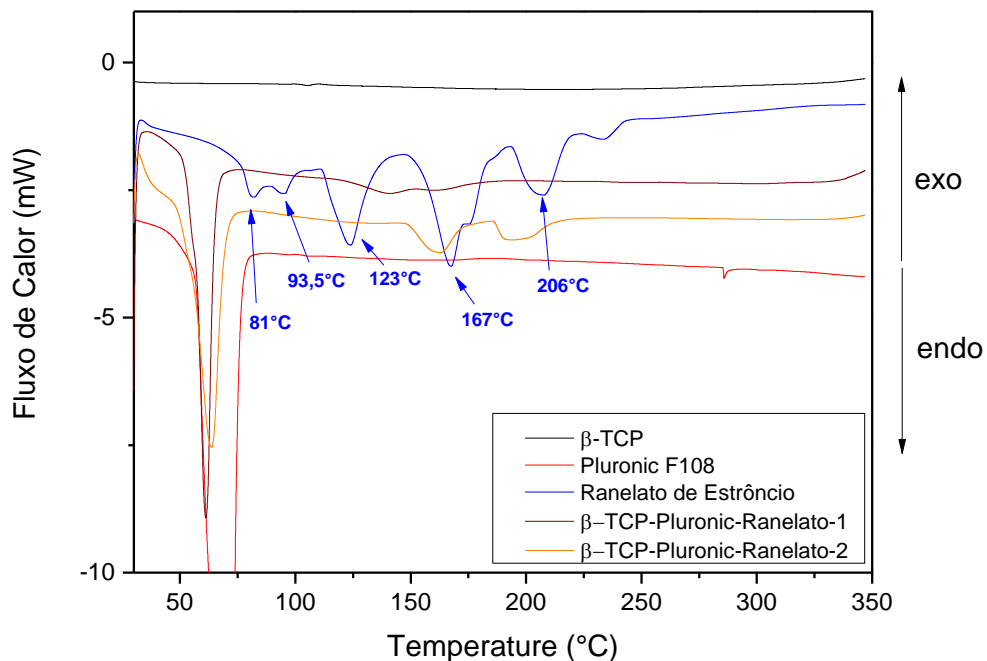
Fonte: Autora.

Analisando os termogramas dos compósitos observa-se a temperatura de fusão do copolímero é menor, quando comparado ao termograma do Pluronic® F108. Para o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1, a temperatura foi de 61 °C e para o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 63,5 °C. A variação da temperatura de fusão, se deve ao recobrimento superficial do grão de  $\beta$ -TCP. Desta maneira a difusão de calor é facilitada pela maior superfície de contato do polímero.

É apresentado na Figura 43 a ampliação dos termogramas entre as temperaturas de 30 e 45°C e confirma-se que não ocorre nenhum evento térmico nesta faixa de temperatura, para o  $\beta$ -TCP e Pluronic® F108, individualmente, assim como para os compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2. Conclui-se que o material é estável em 37°C, temperatura que serão realizados os testes de liberação controlada dos agentes osteogênicos, garantindo assim que não haverá degradação ou desestabilização do compósito durante os testes.

Para a análise dos eventos térmicos do ranelato de estrôncio e dos eventos correspondentes nos compósitos, são apresentados os termogramas na Figura 44 com uma aproximação de fluxo de calor (na faixa de -10 mW a 1 mW), na faixa de temperatura de 0°C a 350°C.

**Figura 44** – Curvas de DSC das amostras de  $\beta$ -TCP, Pluronic® F108, ranelato de estrôncio, compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 na faixa de -3 mW a -8 mW.



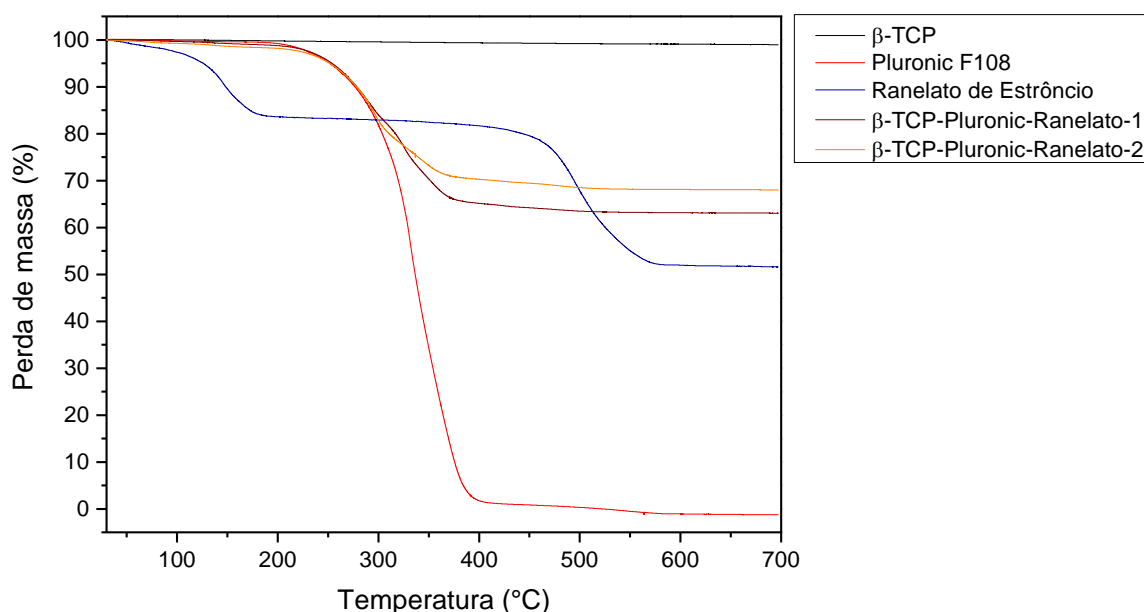
Fonte: Autora.

No termograma do ranelato de estrôncio, verifica-se três eventos endotérmicos consecutivos referentes a desidratação, em 81 °C, 93,5 °C e 123 °C. Estes eventos não estão presentes nos compósitos, uma vez que o fármaco perde as águas de hidratação no processo de preparo do compósito. Em 167 °C e 206 °C são identificados dois eventos endotérmicos no termograma do fármaco. Possivelmente, são referentes a fusão e decomposição do ranelato de estrôncio, respectivamente. Esses dois eventos são identificados nos termogramas dos compósitos, indicando a presença do fármaco na composição dos compósitos.

#### 4.5.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas das amostras grão de  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108 e fármaco ranelato de estrôncio e dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 são apresentadas na Figura 45. Para estas amostras, também será possível determinar a composição de cada compósito.

**Figura 45** – Curvas de TG das amostras de grão  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108, Ranelato de Estrôncio,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e Composito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2.



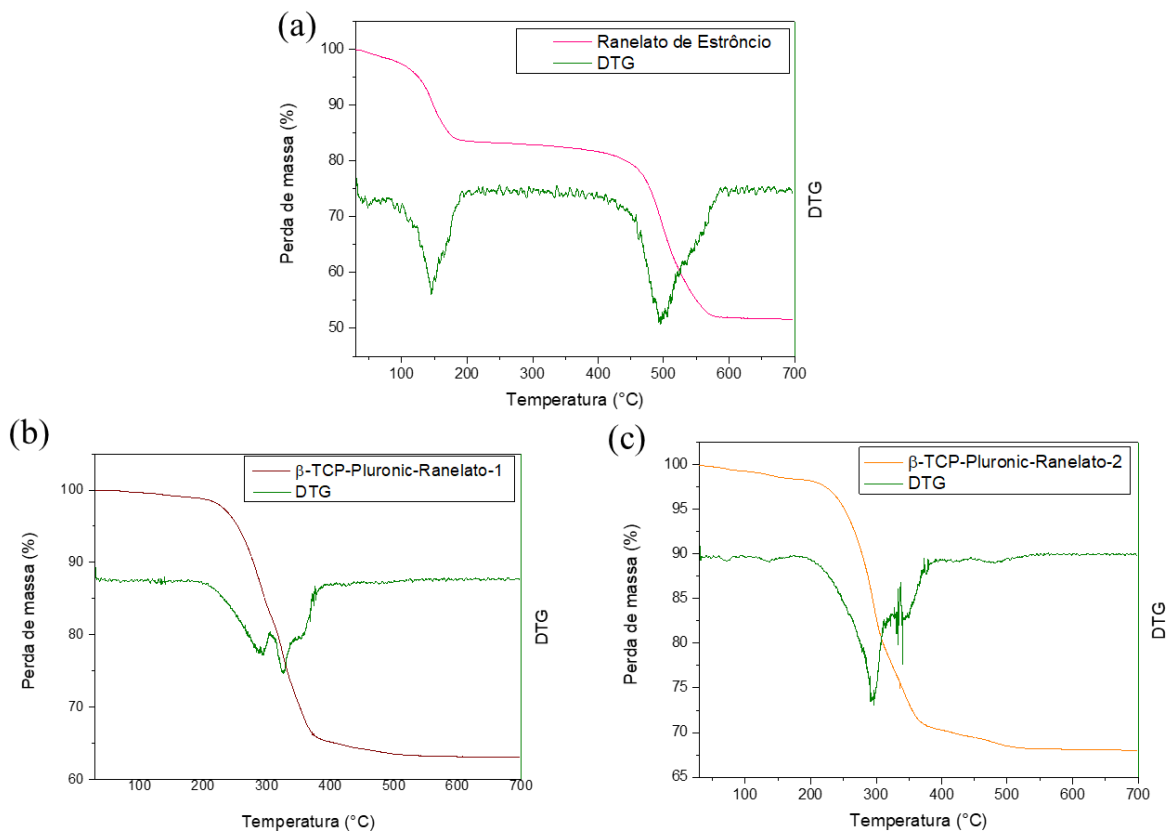
**Fonte:** Autora.

Nas Figuras 46 (a), (b) e (c) são apresentadas as curvas TG-DTG das amostras ranelato de estrôncio e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2, respectivamente. Na curva termogravimétrica do fármaco estão presentes duas etapas de perda de massa. A primeira perda de massa de 17%, entre 80°C e 200°C, é referente às moléculas de água de hidratação.

Na segunda etapa, entre 400 °C e 600°C, corresponde a decomposição do ranelato de estrôncio em óxido de estrôncio, apresentando uma perda de massa de 31%.

Analisando as curvas dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2, observou-se apenas uma perda de massa entre 200°C e 400°C. Esta perda é atribuída a decomposição do copolímero e ocorreu em duas etapas. O compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1, apresentou perda de massa de 40%, referente esta degradação, enquanto no compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2, a perda foi de 30%. Isso confirma as diferentes composições dos compósitos.

**Figura 46** – Curvas de TG-DTG das amostras (a) alendronato, (b) Composito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e (c) Composito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2.

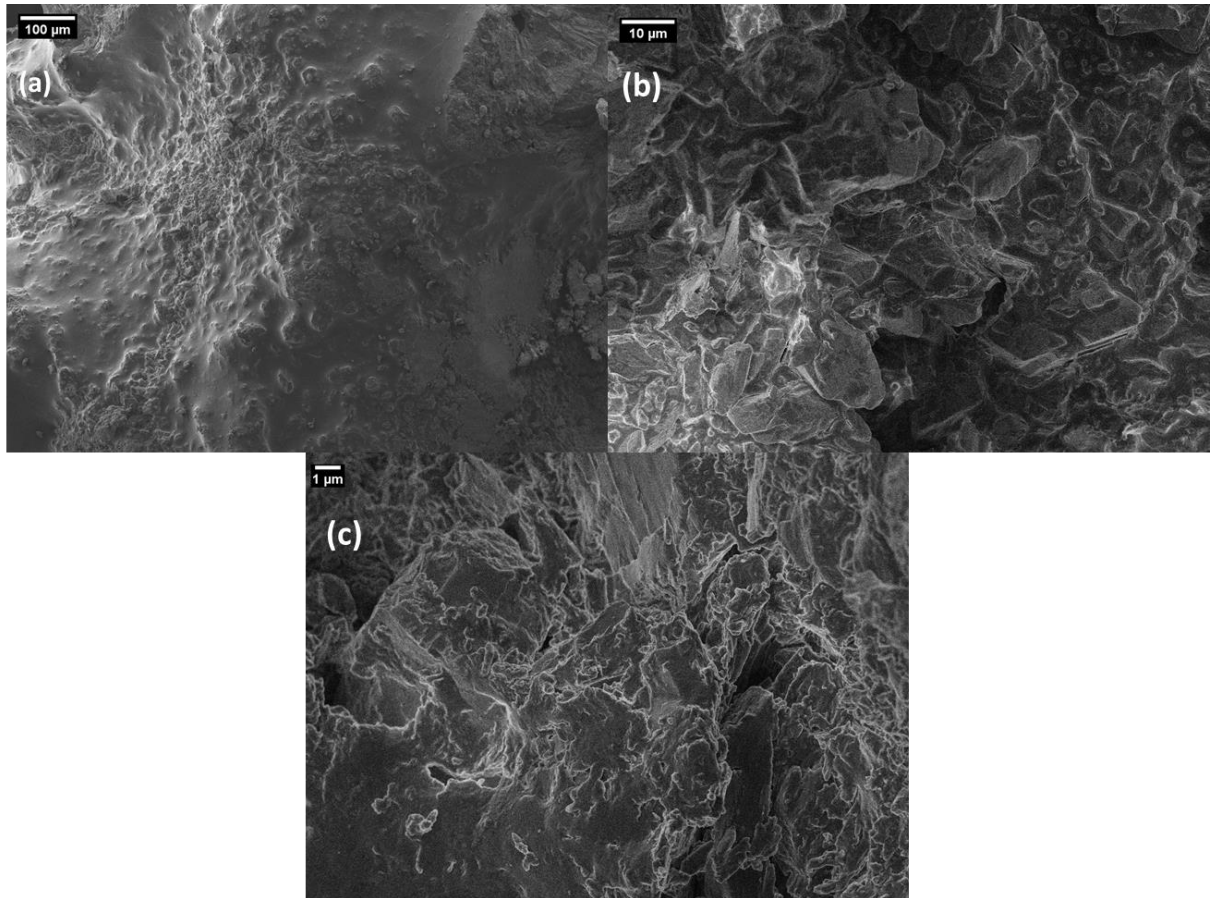


**Fonte:** Autora.

#### 4.5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 também foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura. As micrografias são apresentadas na Figura 47.

**Figura 47** – Micrografias eletrônicas de alta resolução da amostra (a), (b) e (c)  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1.



**Fonte:** Autora.

Na Figura 47 (a) é apresentado o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 com uma aproximação de 40 vezes, e observa-se o recobrimento do grão pelo polímero. Neste caso, a superfície não é rugosa e apresenta muitas ranhuras e falhas. Na Figuras 47 (b) e (c), observa-se maiores detalhes do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1. Este compósito apresenta aspectos diferente dos demais compósitos, com superfícies como muitas falhas, onde o recobrimento polimérico está sobre formatos retangulares e não mais arredondados e com os poros das demais amostras. Essa alteração na morfologia é devido ao fármaco disperso na matriz polimérica, que apresenta grandes cristais na superfície.

#### **4.6. Estudos de Liberação**

Após estudos e caracterização das possíveis matrizes poliméricas, determinou-se o copolímero Pluronic<sup>®</sup> F108 o mais adequado para o estudo de liberação dos agentes osteogênicos em estudo. Realizou-se os testes de liberação com os compósitos caracterizados

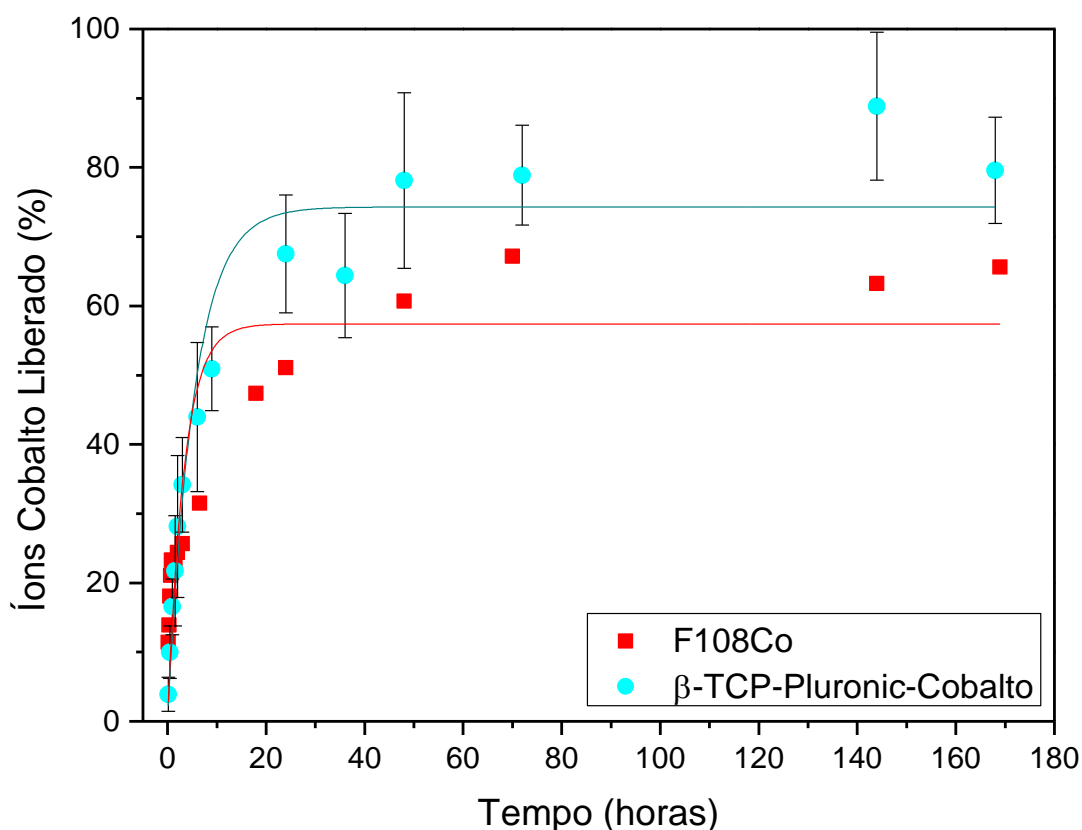
anteriormente:  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2.

Obteve-se curvas de liberação para cada compósito a partir da quantificação de amostras por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, utilizando curvas de calibração previamente preparadas para cada agente. Em todos os testes de liberação seguiu-se a metodologia e equação apresentadas por Deng et al. (2014) para o cálculo da porcentagem liberada de íons cobalto, alendronato ou ranelato de estrôncio, como descrito no item 4.2.2.2.

#### 4.6.1. Curva de Liberação de Íons Cobalto

A curva de liberação do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto está apresentada na Figura 48. Para fins de comparação, a curva da liberação da matriz polimérica é ilustrada também. Para a quantificação de íons cobalto utilizou-se a metodologia descrita no item 3.6.1 e a curva de calibração já apresentada no item 4.2.2.1.

**Figura 48** – Curva de liberação de íons cobalto das amostras F108Co e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto.



**Fonte:** Autora.



Analisando as curvas de liberação da Figura 48, observa-se que a liberação de  $\text{Co}^{2+}$  a partir do material compósito apresenta um perfil semelhante à liberação de cobalto da matriz polimérica. A liberação dos íons é crescente até 48 horas após o início do teste. Em seguida, a liberação de  $\text{Co}^{2+}$  mantém-se constante até o término da coleta de alíquotas, depois de 7 dias. O máximo de cobalto liberado foi de aproximadamente 88%, apresentando pequenas variações durante o período de estudo.

Comparando a liberação de cobalto do compósito e da matriz polimérica, verifica-se que a liberação do compósito foi mais rápida e uma maior porcentagem de íons foi liberada. No caso do material compósito, o copolímero recobre o grão e apresenta uma maior superfície de contato com o meio, logo solubiliza-se mais rapidamente, quando comparado com a matriz polimérica. Além disso, verificou-se que o polímero não interage com o grão de  $\beta$ -TCP, então o cobalto se encontra apenas na camada mais superficial do compósito. Assim, é necessário somente a solubilização do polímero para liberação do íon. Mesmo ocorrendo em uma velocidade maior, a liberação ainda no período do processo inflamatório<sup>112</sup>.

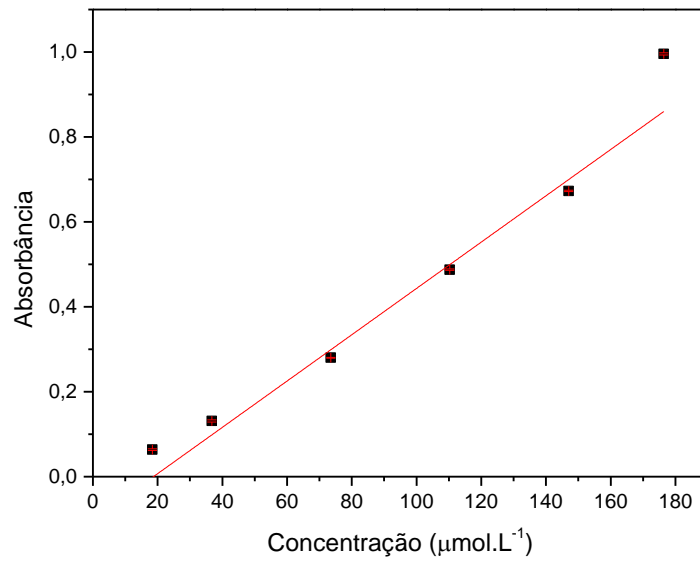
No final do processo, o grão apresentou morfologia semelhante ao do início da liberação. Esta característica é importante quando considera-se utilizar o material cerâmico como enxerto ósseo e matriz de liberação controlada, pois ao final da espera-se sua utilização como suporte e sustentação para novas células osteogênicas e para a formação do tecido ósseo.

#### **4.6.2. Curva de Liberação de Alendronato**

Foram feitos os testes de liberação dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2.

Para a quantificação das amostras de liberação, preparou-se uma curva de calibração de alendronato, seguindo a metodologia descrita no item 3.6.2. Na Figura 49 é apresentada a curva de calibração obtida a partir da análise em triplicata das concentrações já conhecidas de alendronato e dos valores de absorvância correspondente obtidos.

**Figura 49** – Curva de calibração para determinação de alendronato.

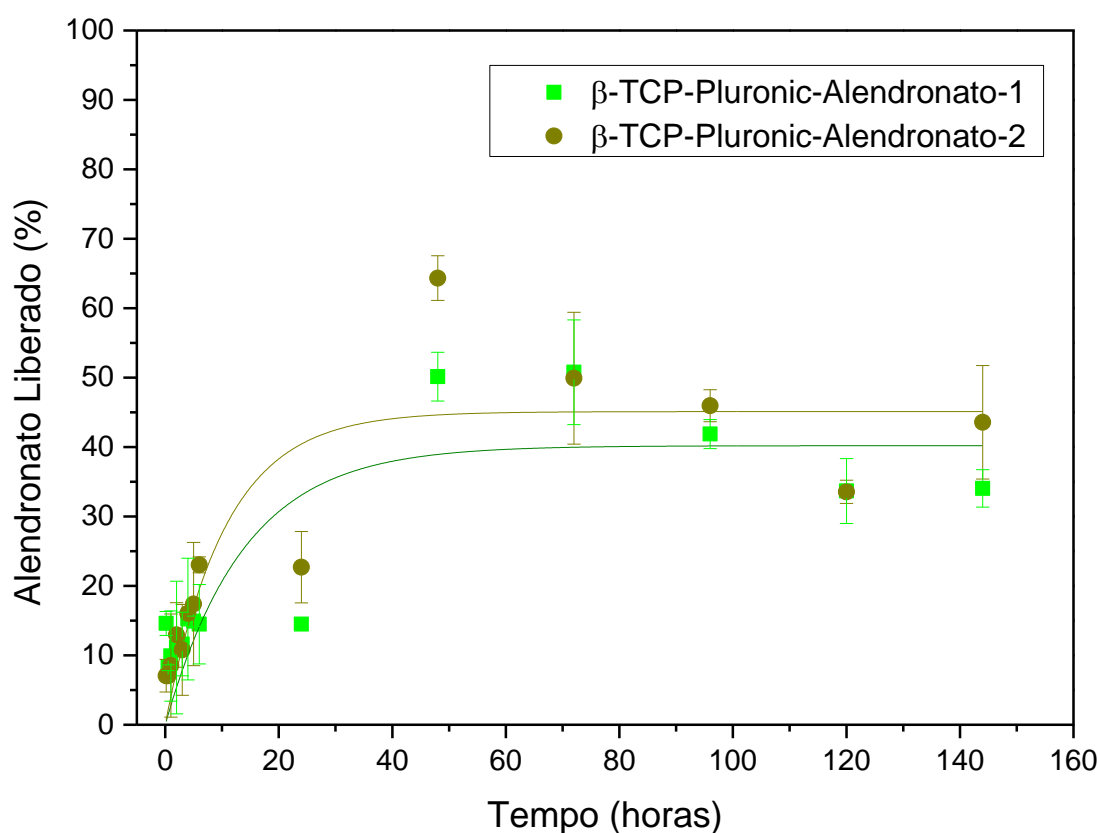


**Fonte:** Autora.

O gráfico foi linearizado, obtendo-se um valor  $R^2$  igual a 0,959 e a seguinte equação da reta:  $y = 0,00545x - 0,102$ , utilizada para o cálculo da concentração de alendronato liberados, segundo a lei de Lambert-Beer dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2, em cada uma das amostragens feitas para a construção das curvas de liberação.

A curva de liberação de alendronato dos compósitos está apresentada na Figura 50.

**Figura 50** – Curva de liberação de alendronato das amostras  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2.



**Fonte:** Autora.

Observando as curvas de liberação identifica-se um perfil semelhante de liberação para os dois compósitos, variando apenas a porcentagem de fármaco liberado. Identifica-se que o processo de liberação ocorre em duas etapas. A primeira ocorre nas primeiras 48 horas de liberação, onde atinge-se a porcentagem máxima de alendronato liberado. Em seguida, a porcentagem liberada é reduzida e mantida constante a partir de 120 horas até o final da liberação. A amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 alcançou uma liberação de, aproximadamente, 50% de alendronato, enquanto a amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2, 64% de alendronato, até 48 horas. Na segunda etapa do processo de liberação, os compósitos reduzem a liberação a cerca de 30%. Como o alendronato é um fármaco hidrofílico, este interage com a cadeia hidrofílica do copolímero e é liberado conforme ocorre a hidrólise das cadeias poliméricas. Assim, justifica-se a rápida liberação inicial do fármaco, devido a sua concentração nas camadas superficiais e pela hidrólise das cadeias PEO que estão expostas na superfície do compósito.

Em todo decorrer das curvas, determinou-se que a amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 libera uma maior porcentagem de alendronato, quando comparada com a

liberação da amostra  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1. Como o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 contém uma menor concentração de matriz polimérica, a razão alendronato/pluronic é maior. Assim, a hidrólise das cadeias poliméricas libera uma maior porcentagem de alendronato no meio.

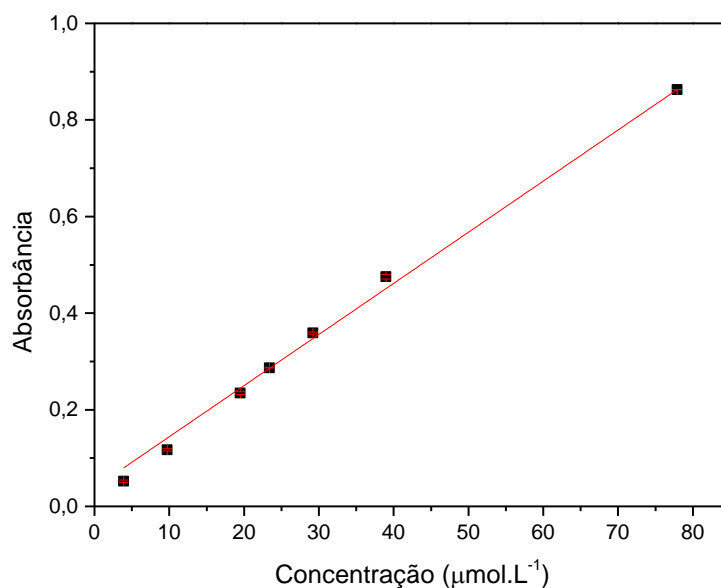
Porém, a diferença entre as duas curvas de liberação não é muito significativa, possibilitando a aplicação dos dois compósitos para a liberação controlada de alendronato. Além disso, a taxa média de liberação de alendronato foi de 60%, indicando a possibilidade de se estender o período de liberação, além do processo inflamatório da fratura óssea. Concluindo-se os testes de liberação, também se observou que o grão de  $\beta$ -TCP não havia degradado.

#### 4.6.3. Curva de Liberação de Ranelato de Estrôncio

Seguindo os estudos de liberação, realizou-se os testes dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2.

A quantificação das amostras de liberação foi realizada seguindo a metodologia descrita no item 3.6.3 a partir da comparação com a curva de calibração de ranelato de estrôncio preparada. Na Figura 51 é apresentada a curva de calibração obtida a partir da análise em triplicata das concentrações já conhecidas de ranelato de estrôncio e dos valores de absorvância correspondente obtidos.

**Figura 51** – Curva de calibração para determinação de ranelato de estrôncio.

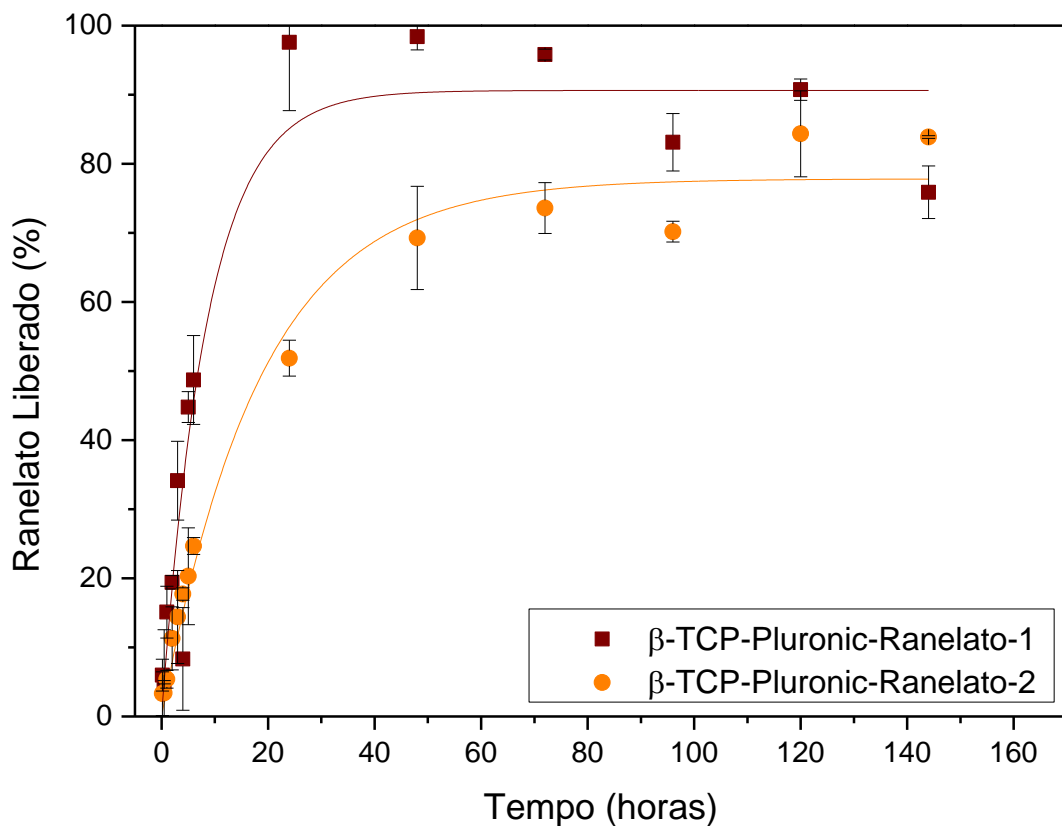


**Fonte:** Autora.

O gráfico foi linearizado, obtendo-se um valor  $R^2$  igual a 0,999 e a seguinte equação da reta:  $y = 0,0384x + 0,0106$ , utilizada para o cálculo da concentração de ranelato liberado, segundo a lei de Lambert-Beer dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2, em cada uma das amostragens feitas para a construção das curvas de liberação.

A curva de liberação de ranelato de estrôncio dos compósitos está apresentada na Figura 52.

**Figura 52** – Curva de liberação de ranelato de estrôncio das amostras  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2.



**Fonte:** Autora.

A liberação de ranelato de estrôncio do compósito apresenta um perfil semelhante a liberação de íons cobalto do compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto. Há um aumento crescente da porcentagem de ranelato de estrôncio nas primeiras 48 horas do teste. Para o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1, a máxima liberação foi de aproximadamente 95%. Neste caso, nota-se que este compósito atingiu o máximo de liberação, seguido do decaimento da concentração no meio, indicando que todo ranelato de estrôncio foi liberada. O compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-

2, alcançou cerca de 74% de liberação de ranelato de estrôncio, mantendo esta liberação constante até o final do teste.

Notou-se uma variação na liberação comparando-se os dois compósitos, onde o material com maior concentração de polímero ( $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1) liberou uma porcentagem maior de fármaco. O ranelato de estrôncio apresenta uma particularidade, que sua taxa de liberação diminui em ambientes mais hidrofílicos<sup>119</sup>. No caso desta liberação, como a relação fármaco/pluronic é menor no  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1. Assim, o fármaco está interagindo com mais cadeias hidrofóbicas, quando comparado com o compósito  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2. Portanto, conforme ocorre a solubilização de cadeias hidrofílicas do copolímero, o compósito se torna mais hidrofóbico, devido às cadeias hidrofóbicas expostas. Assim, há um aumento na taxa de liberação do fármaco.

Desta maneira, foi determinado que o  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 apresenta características mais adequadas para aplicação do compósito na liberação controlada para tratamento de osteoporose, uma vez que mantém a taxa de liberação constante durante o período inflamatório. O  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 libera o fármaco quase na sua totalidade nas primeiras 48 horas, não se aplicando para tratamentos mais longos.

No final destes testes, também se observou que o grão manteve a morfologia inicial, não apresentando sinais de degradação.

#### 4.6.4. Análise Cinética

Com a finalidade de simplificar e compreender o processo de liberação de fármacos em materiais específicos, modelos matemáticos são aplicados para descrever a base dos mecanismos de transporte massas. No caso de matrizes poliméricas, os principais mecanismos relacionados a liberação controlada de fármaco são: difusão do soluto, intumescimento da matriz polimérica ou degradação do material<sup>111,122</sup>.

Utilizou-se os principais modelos cinéticos de liberação controlada para matriz polimérica, Korsmeyer-Peppas e Primeira Ordem, para determinar o mecanismo correspondente para a liberação de cada agente osteogênico da matriz polimérica.

O modelo de Korsmeyer-Peppas descreve a liberação do fármaco pela seguinte equação:

$$M_t = M_\infty K t^n \text{ (Equação 2)}$$

Onde  $M_t$  é a quantidade de fármaco liberado por tempo ( $t$ ),  $M_\infty$  é a quantidade de fármaco liberado em um tempo tendendo ao infinito,  $K$  é a constante de difusão do processo e  $n$  o expoente dependente do mecanismo de liberação<sup>123,124</sup>.

Já o modelo cinético de Primeira Ordem descreve a liberação do fármaco pela seguinte equação:

$$M_t = M_\infty [1 - \exp(-K_1 t)] \text{ (Equação 3)}$$

Onde  $K_1$  é a constante de liberação de Primeira Ordem. Tal modelo é dependente da concentração de fármaco<sup>122</sup>.

Para análise e determinação do modelo cinético que melhor descreve o mecanismo de liberação, determina-se avaliar os valores de coeficiente de correção e das constantes de cada equação. Os dados das liberações dos cinco compósitos estudados foram ajustados nas equações dos modelos cinéticos e os resultados são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11** – Valores obtidos a partir de ajuste linear das curvas de liberação seguindo modelos cinéticos de Korsmeier-Peppas e de Primeira Ordem.

Compósito	Korsmeier-Peppas			Primeira Ordem	
	$K$	$R^2$	$n$	$K_1$	$R^2$
<b><math>\beta</math>-TCP-Pluronic-Cobalto</b>	4,29	0,901	0,325	0,187	0,966
<b><math>\beta</math>-TCP-Pluronic-Alendronato-1</b>	3,31	0,639	0,279	0,072	0,634
<b><math>\beta</math>-TCP-Pluronic-Alendronato-2</b>	3,46	0,676	0,288	0,095	0,757
<b><math>\beta</math>-TCP-Pluronic-Ranelato-1</b>	4,91	0,726	0,289	0,117	0,923
<b><math>\beta</math>-TCP-Pluronic-Ranelato-2</b>	3,38	0,960	0,417	0,054	0,982

Fonte: Autora.

Na análise de resultados, considerando o modelo cinético de Korsmeier-Peppas, deve-se levar em conta o valor do coeficiente de correlação e do expoente  $n$ , que descreve o mecanismo de liberação. Se  $n = 0,5$ , descreve-se o mecanismo como difusão Fickiana, ou seja, a liberação depende do processo de relaxação do polímero, uma vez que o tempo de relaxação de um polímero é muito maior que o tempo de difusão do solvente do meio. No caso de  $n = 1$ , a cinética de liberação corresponde a ordem zero (denominada de transporte caso II), ou seja, independe do tempo. Quando  $0,5 < n < 1,0$ , o processo de liberação principal é por transporte anômalo, também denominado difusão não-Fickiana, que consiste na combinação da difusão Fickiana e transporte do caso II<sup>122-124</sup>.

Além disso, os resultados de coeficiente de correlação para o modelo cinético de Primeira Ordem apresentaram valores mais satisfatórios e optou-se por aplicá-lo às cinco curvas de liberação. Isso indica que a liberação dos sistemas poliméricos apresenta uma rápida liberação inicial, mantendo-se estável por um período mais extenso <sup>111</sup>.

Ambos compósitos com o fármaco Alendronato são uma exceção ao estudo e não seguem nenhum dos modelos cinéticos de liberação de matrizes poliméricas propostos. O perfil do gráfico de liberação indica um processo que ocorre em duas etapas, a rápida liberação inicial, seguida de liberação de concentrações intermediárias do fármaco.

Portanto, para os compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2, determinou-se que o modelo de Primeira Ordem descreve a liberação controlada. Este processo ocorre pela rápida liberação e dissolução do fármaco que se encontra na superfície, em contato direto com o meio de dissolução, seguida de uma liberação constante <sup>111,125</sup>.



## 5. Conclusões

O preparo dos materiais compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 foram realizados com sucesso. As caracterizações realizadas, FTIR, DRX, DSC e TGA, confirmaram a presença da fase cerâmica e do copolímero nos materiais. Além disso, a partir das análises de FTIR, DSC e TGA foi possível identificar que houve a incorporação dos agentes e a interação entre o cloreto de cobalto e a matriz polimérica. Pela Microscopia Eletrônica de Varredura foi possível observar a morfologia do  $\beta$ -TCP, do polímero e o recobrimento do Pluronic<sup>®</sup> sobre o grão no material compósito preparado. Os testes de liberação de íons cobalto da matriz polimérica, possibilitaram a seleção do Pluronic<sup>®</sup> F108, uma vez que o mesmo apresentou o perfil de liberação mais adequado para a aplicação proposta neste trabalho. E, por fim, os testes de liberação foram bem-sucedidos. Os materiais compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Cobalto,  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-2 apresentaram um perfil de liberação semelhante, descrito pelo modelo cinético de Primeira Ordem. Já os perfis de liberação dos compósitos  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-1 e  $\beta$ -TCP-Pluronic-Alendronato-2 foram semelhantes entre eles, porém a cinética de liberação não pode ser descrita seguindo mecanismos de liberação de matrizes poliméricas. Ao final dos testes de liberação, não houve degradação no grão de  $\beta$ -TCP presente nos compósitos, indicando que o material cerâmico se mostrou adequado para a utilização como suporte para liberação. Com exceção do  $\beta$ -TCP-Pluronic-Ranelato-1, no qual a liberação do fármaco foi muito acelerada, os demais compósitos apresentaram liberação adequada em um período importante para a regeneração óssea, sendo possível que atuem durante o processo inflamatório das fraturas, acelerando o processo de regeneração óssea.

## 6. Perspectivas

Está em andamento um estudo da toxicidade dos materiais  $\beta$ -TCP, Pluronic<sup>®</sup> F108 e nos compósitos, além de testes *in vivo* dos materiais compósitos, para avaliar a capacidade dos sistemas de liberação na regeneração de tecidos ósseos. Ao final, propõe-se avaliar qual agente osteogênico apresenta melhor resultados para regeneração óssea.

## 7. Referência

- 1 SAMBROOK, P.; COOPER, C. Osteoporosis. **Lancet**, v. 367, p. 2010–2018, 2006.
- 2 TU, K. N. et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 43, n. 2, p. 92–104, 2018.
- 3 ARCOS, D. et al. The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 5, p. 1793–1805, 2014.
- 4 HIREMATH, R. N. et al. Osteoporosis among household women: A growing but neglected phenomenon. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 74, n. 1, p. 5–10, 2018.
- 5 QASEEM, A. et al. Treatment of low bone density or osteoporosis to prevent fractures in men and women: A clinical practice guideline update from the American college of physicians. **Annals of Internal Medicine**, v. 166, n. 11, p. 818–839, 2017.
- 6 RACHNER, T. D.; KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. Osteoporosis: Now and the future. **The Lancet**, v. 377, n. 9773, p. 1276–1287, 2011.
- 7 HALL, B. K. **Bones and Cartilage**. USA: Elsevier Ltd., 2015.
- 8 JOHNSON, L. R. **Fundamentos da Fisiologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- 9 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- 10 BIGHAM-SADEGH, A.; ORYAN, A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. **International Wound Journal**, v. 12, n. 3, p. 238–247, 2015.
- 11 KANIS, J. A. Osteoporosis III: Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. **Lancet**, v. 359, n. 9321, p. 1929–1936, 2002.
- 12 CHEUNG, W. H. et al. Fracture healing in osteoporotic bone. **Injury**, v. 47, p. S21–S26, 2016.
- 13 LOI, F. et al. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**, v. 86, p. 119–130, 2016.
- 14 AL-AQL, Z. S. et al. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 2, p. 107–118, 2008.
- 15 CRAIG, L. E.; DITTMER, K. E.; THOMPSON, M. G. Bones and Joints. In: MAXIE, M. G. (Ed.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6. ed. St. Louis: Ltd, Elsevier, 2016. p. 33–35.

- 16 JAKOB, F. et al. Bone tissue engineering in osteoporosis. **Maturitas**, v. 75, n. 2, p. 118–124, 2013.
- 17 BONE, B. L. J. et al. Bone augmentation in rabbit calvariae : comparative study between Bio-Oss s and a novel b -TCP / DCPD granulate. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, p. 922–928, 2006.
- 18 ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. **Materials**, v. 10, n. 4, 2017.
- 19 KYLLÖNEN, L. et al. Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. **Acta Biomaterialia**, v. 11, n. 1, p. 412–434, 2015.
- 20 LIU, H. **Nanocomposites for Orthopedic Tissue Regeneration and Drug Delivery**. [s.l.] VDM Verlag Dr. Müller, 2009.
- 21 BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 4, p. 1401–1421, 2012.
- 22 RAI, B. et al. Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. **Biomaterials**, v. 26, n. 17, p. 3739–3748, 2005.
- 23 DU, X. et al. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 12, p. 3731–3743, 2012.
- 24 GAO, Y. et al. Basic fibroblast growth factor suspended in Matrigel improves titanium implant fixation in ovariectomized rats. **Journal of Controlled Release**, v. 139, n. 1, p. 15–21, 2009.
- 25 KARGOZAR, S. et al. Synthesis, physico-chemical and biological characterization of strontium and cobalt substituted bioactive glasses for bone tissue engineering. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 449, p. 133–140, 2016.
- 26 THORMANN, U. et al. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8589–8598, 2013.
- 27 KULANTHAIVEL, S. et al. Cobalt doped proangiogenic hydroxyapatite for bone tissue engineering application. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 648–658, 2016.
- 28 DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 9, p. 1032–1045, 2008.
- 29 GIGER, E. V.; CASTAGNER, B.; LEROUX, J. C. Biomedical applications of bisphosphonates. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 2, p. 175–188, 2013.

- 30 RUSSELL, R. G. G. et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporosis International**, v. 19, n. 6, p. 733–759, 2008.
- 31 KHAJURIA, D. K. et al. Risedronate/zinc-hydroxyapatite based nanomedicine for osteoporosis. **Materials Science and Engineering C**, v. 63, p. 78–87, 2016.
- 32 PARASARAM, V. et al. Bisphosphonate-calcium phosphate cement composite and its properties. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 1, n. March, p. 1–9, 2019.
- 33 PETER, B. et al. Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 76, n. 1, p. 133–143, 2006.
- 34 VERRON, E. et al. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. **Drug discovery today**, v. 15, n. 13–14, p. 547–552, 2010.
- 35 FISHER, J.; REDDI, A. Functional tissue engineering of bone: signals and scaffolds. In: **Topics in Tissue Engineering**. N. Ashamma ed. [s.l.] University of Oulu, 2003. p. 1–29.
- 36 KHAN, F.; TANAKA, M.; AHMAD, S. R. Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices. **J. Mater. Chem. B**, v. 3, p. 8224–8249, 2015.
- 37 N., B. et al. Development of a bioactive porous collagen/ $\beta$ -tricalcium phosphate bone graft assisting rapid vascularization for bone tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 106, n. 1, p. 73–85, 2018.
- 38 JAHAN, K.; MEKHAIL, M.; TABRIZIAN, M. One-step fabrication of apatite-chitosan scaffold as a potential injectable construct for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 60–70, 2019.
- 39 SANDOR, G. K. B.; LINDHOLM, T. C.; CLOKIEE, C. M. L. Bone Regeneration of the Cranio- maxillofacial and Dento-alveolar Skeletons in the Framework of Tissue Engineering. In: **Topics in Tissue Engineering**. N. Ashamma ed. [s.l.] University of Oulu, 2003. p. 1–46.
- 40 DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, v. 20, n. 23–24, p. 2287–2303, 1999.
- 41 PUPPI, D. et al. Polymeric materials for bone and cartilage repair. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 4, p. 403–440, 2010.
- 42 ZHANG, Y.; ZHANG, M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, n. 3, p. 304–312, 2001.
- 43 SARIKAYA, B.; AYDIN, H. M. Collagen/Beta-Tricalcium Phosphate Based Synthetic Bone Grafts via Dehydrothermal Processing. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

- 44 CAO, C. et al. Mechanical reinforcement of injectable calcium phosphate cement/silk fibroin (SF) composite by mineralized SF. **Ceramics International**, v. 40, n. 9 PART A, p. 13987–13993, 2014.
- 45 ISHIKAWA, K. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. **Biomaterials**, v. 16, n. 7, p. 527–532, 1995.
- 46 HOQUE, M. E. et al. Fabrication using a rapid prototyping system and in vitro characterization of PEG-PCL-PLA scaffolds for tissue engineering. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 16, n. 12, p. 1595–610, 2005.
- 47 HUANG, M. H. et al. Synthesis and Characterization of Block Copolymers of  $\epsilon$ -Caprolactone and DL-Lactide Initiated by Ethylene Glycol or Poly(ethylene glycol). **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 204, n. 16, p. 1994–2001, 2003.
- 48 CHEN, S. et al. Comparative study of poly (lactic-co-glycolic acid)/tricalcium phosphate scaffolds incorporated or coated with osteogenic growth factors for enhancement of bone regeneration. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 2, n. 2, p. 91–104, 2014.
- 49 LI, H.; LI, J.; YE, J. Construction and properties of poly(lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composite pellets with microspheres-in-pellet structure for bone repair. **Ceramics International**, v. 42, n. 4, p. 5587–5592, 2016.
- 50 ROY, A. et al. Porous calcium phosphate-poly (lactic-co-glycolic) acid composite bone cement: A viable tunable drug delivery system. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 92–101, 2016.
- 51 ZHANG, H. X. et al. Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 103, n. 10, p. 3250–3258, 2015.
- 52 FU, S. et al. Injectable and thermo-sensitive PEG-PCL-PEG copolymer/collagen/n-HA hydrogel composite for guided bone regeneration. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4801–4809, 2012.
- 53 HAJIALI, F.; TAJBAKHS, S.; SHOJAEI, A. Fabrication and Properties of Polycaprolactone Composites Containing Calcium Phosphate-Based Ceramics and Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering: A Review. **Polymer Reviews**, v. 58, n. 1, p. 164–207, 2018.
- 54 NI, P. et al. Injectable thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel/acellular bone matrix composite for bone regeneration in cranial defects. **Biomaterials**, v. 35, n. 1, p. 236–248, 2014.
- 55 SOUZA, M. A. et al. Magnetic Nanoparticles Surface Modified with Biodegradable Polymers for Controlled Methotrexate Delivery in Cancer Therapy. **Journal of Nanopharmaceutics and Drug Delivery**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2015.
- 56 VELU, R. et al. Post-process composition and biological responses of laser sintered PMMA and  $\beta$ -TCP composites. **Journal of Materials Research**, v. 33, n. 14, p. 1987–1998, 2018.

- 57 DEVOE, K. et al. Resorbable tricalcium phosphates for bone tissue engineering: Influence of SrO doping. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 95, n. 10, p. 3095–3102, 2012.
- 58 KOÇ, N.; TIMUÇIN, M.; KORKUSUZ, F. Fabrication and characterization of porous tricalcium phosphate ceramics. **Ceramics International**, v. 30, n. 2, p. 205–211, 2004.
- 59 ZOU, C. et al. Preparation and characterization of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate/collagen composites with an integrated structure. **Biomaterials**, v. 26, n. 26, p. 5276–5284, 2005.
- 60 RYU, H. S. et al. Magnesia-doped HA/ $\beta$ -TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 393–401, 2004.
- 61 SHOKRGOZAR, M. A. et al. Biocompatibility evaluation of HDPE-UHMWPE reinforced  $\beta$ -TCP nanocomposites using highly purified human osteoblast cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 95, n. 4, p. 1074–1083, 2010.
- 62 DINIZ, I. M. A. et al. Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 3, p. 1–10, 2015.
- 63 BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 98–106, 2008.
- 64 KULTHE, S. S. et al. Mixed micelle formation with hydrophobic and hydrophilic Pluronic block copolymers: Implications for controlled and targeted drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 2, p. 691–696, 2011.
- 65 EL-SHERBINY, I. M.; MCGILL, S.; SMYTH, H. D. C. Swellable Microparticles as Carriers for Sustained Pulmonary Drug Delivery. **J Pharm Sci**, v. 99, n. 5, p. 1–30, 2010.
- 66 PITTO-BARRY, A.; BARRY, N. P. E. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. **Polym. Chem.**, v. 5, n. 10, p. 3291–3297, 2014.
- 67 OH, K. T.; BRONICH, T. K.; KABANOV, A. V. Micellar formulations for drug delivery based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic block copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 94, n. 2–3, p. 411–422, 2004.
- 68 ALVAREZ-LORENZO, C.; SOSNIK, A.; CONCHEIRO, A. PEO-PPO block copolymers for passive micellar targeting and overcoming multidrug resistance in cancer therapy. **Current drug targets**, v. 12, n. 8, p. 1112–1130, 2011.
- 69 WU, C. et al. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 33, n. 7, p. 2076–2085, 2012.
- 70 FAN, W.; CRAWFORD, R. W.; XIAO, Y. Enhancing in vivo vascularized bone formation by cobalt chloride-treated bone marrow stromal cells in a tissue engineered periosteum model. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3580–3589, 2010.

- 71 PEREZ, R. A. et al. Novel therapeutic core-shell hydrogel scaffolds with sequential delivery of cobalt and bone morphogenetic protein-2 for synergistic bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 23, p. 295–308, 2015.
- 72 ZENG, H. L. et al. Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **BMC Cell Biology**, v. 12, p. 1–10, 2011.
- 73 ZHANG, M. et al. Preparation, characterization and in vitro angiogenic capacity of cobalt substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 40, p. 21686, 2012.
- 74 BIRGANI, Z. T. et al. Stimulatory effect of cobalt ions incorporated into calcium phosphate coatings on neovascularization in an in vivo intramuscular model in goats. **Acta Biomaterialia**, v. 36, p. 267–276, 2016.
- 75 KARGOZAR, S. et al. Strontium- and cobalt-substituted bioactive glasses seeded with human umbilical cord perivascular cells to promote bone regeneration via enhanced osteogenic and angiogenic activities. **Acta Biomaterialia**, v. 58, p. 502–514, 2017.
- 76 ALBU, P. et al. Thermal behavior of sodium alendronate: A kinetic study under non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 1, p. 571–576, 2017.
- 77 DOCA, S. C. et al. Sodium alendronate used in bone treatment: A complex study on the thermal behavior of the bioactive compound and its binary mixtures with several excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 126, n. 1, p. 189–194, 2016.
- 78 BECERRIL, N. V.; TELLEZ-JURADO, L.; RODRIGUEZ-LORENZO, L. M. Adsorption of fibronectin on hydroxyapatite functionalized with alendronate. **Journal of the Australian Ceramic Society**, v. 49, n. 2, p. 112–118, 2013.
- 79 TRICARICO, P. M. et al. Alendronate treatment induces IL-1B expression and apoptosis in glioblastoma cell line. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 285–290, 2018.
- 80 BRENNAN, T. C. et al. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 7, p. 1291–1300, 2009.
- 81 DEEKS, E. D.; DHILLON, S. Strontium Ranelate. **Drugs**, v. 70, n. 6, p. 733–759, 2010.
- 82 MARIE, P. J. Strontium ranelate: New insights into its dual mode of action. **Bone**, v. 40, n. 5 SUPPL., p. 5–8, 2007.
- 83 BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, v. 42, n. 1, p. 129–138, 2008.
- 84 CAVO, M.; SCAGLIONE, S. Scaffold microstructure effects on functional and mechanical performance: Integration of theoretical and experimental approaches for bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 872–879, 2016.

- 85 KRAJEWSKI, A. et al. Porous ceramic bodies for drug delivery. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 11, n. 12, p. 763–771, 2000.
- 86 WANG, B.; SIAHAAN, T.; SOLTERO, R. **Drug Delivery Principles and Applications**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- 87 RANADE, V. V.; HOLLINGER, M. A. **Drug Delivery Systems**. Segunda Ed ed. [s.l.] CRC Press LLC, 2004.
- 88 CHIOU, W. L.; RIEGELMANT, S. Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 9, p. 1281–1302, 1971.
- 89 CRAIG, D. Q. M. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 231, p. 131–144, 2002.
- 90 D'SOUZA, S. S.; DELUCA, P. P. Methods to assess in Vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 3, p. 460–474, 2006.
- 91 LEVY, M. Y.; BENITA, S. Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 66, n. 1–3, p. 29–37, 1990.
- 92 GUTZ, G. R. (Received 18 March 1985; accepted 19 June 1985). v. 4, n. 12, p. 0–7, 1985.
- 93 VOGEL, A. I. **A text-book of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis**. 4a. ed. Londres: Longmans, Green and Co LTD, 1954.
- 94 WEST, P. W.; VRIES, C. G. D. E. Nature of the Cobalt-Thiocyanate Reaction. **Analytical chemistry**, v. 23, n. 2, p. 334–337, 1951.
- 95 SADER, A. P. DE O. “ Estudo espectrofotométrico do sistema cobalto ( II )/ tiocianato e seu aproveitamento analítico ”. 2002.
- 96 HADDOUB, R. et al. Cobalt thiocyanate reagent revisited for cocaine identification on TLC. **New Journal of Chemistry**, v. 35, n. 7, p. 1351–1354, 2011.
- 97 TAHA, E. A.; YOUSSEF, N. F. Spectrophotometric Determination of Some Drugs for Osteoporosis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 12, p. 1444–1447, 2003.
- 98 MYTHILI, K. et al. Development and Validation of UV Spectrophotometric Method for the Estimation of Strontium Ranelate in Sachet Formulation. **Research J. Pharm. and Tech.**, v. 4, n. 9, p. 1468–1470, 2011.
- 99 ALSHEMARY, A. Z. et al. Synthesis, Characterization and Optical Properties of Chromium Doped  $\beta$ -Tricalcium Phosphate. **Ceramics International**, v. 41, p. 1663–1669, 2015.
- 100 COELHO, P. G. et al. Physico/chemical characterization and preliminary human histology assessment of a  $\beta$ -TCP particulate material for bone augmentation. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 7, p. 2085–2091, 2009.



101 MAISARA S.M. ARSAD, P. M. L. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles and  $\beta$ -TCP Particles. **2nd International Conference on Biotechnology and Food Science**, v. 7, p. 184–188, 2011.

102 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

103 SU, Y. L.; WANG, J.; LIU, H. Z. FTIR spectroscopic study on effects of temperature and polymer composition on the structural properties of PEO-PPO-PEO block copolymer micelles. **Langmuir**, v. 18, n. 14, p. 5370–5374, 2002.

104 FU, S. et al. Preparation and Characterization of n-Hydroxyapatite/PCL-Pluronic-PCL Nanocomposites for Tissue Engineering. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 2, p. 711–718, 2010.

105 JANDURA, P.; RIEDL, B.; KOKTA, B. V. Thermal degradation behavior of cellulose fibers partially esterified with some long chain organic acids. **Polymer Degradation and Stability**, v. 70, n. 3, p. 387–394, 2000.

106 TADIC, D. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. **Biomaterials**, v. 25, n. 6, p. 987–994, 2003.

107 LIU, C. et al. Facile synthesis of ordered mesoporous carbons from F108/resorcinol-formaldehyde composites obtained in basic media. **Chemical Communications**, n. 7, p. 757–759, 2007.

108 FU, S. Z. et al. In vitro and in vivo degradation behavior of n-HA/PCL-Pluronic-PCL polyurethane composites. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 2, p. 479–486, 2014.

109 DENG, H. et al. PEG-b-PCL copolymer micelles with the ability of pH-controlled negative-to-positive charge reversal for intracellular delivery of doxorubicin. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 11, p. 4281–4292, 2014.

110 CHIOU, W. L.; RIEGELMANT, S. Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 9, p. 1281–1302, 1971.

111 KAMALY, N. et al. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.

112 MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551–555, 2011.

113 GABBOT, P. **Principles and Applications of Thermal Analysis**. 1 ed. ed. [s.l.] Blackwell Publishing, 2008.

114 GRIFFITH, E. J. Thermogravimetric Analysis of Complex Mixtures of Hydrates. **Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 198–202, 1957.

115 RIBAS, J. et al. Solid state kinetic parameters of the dehydration of  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  by isothermal thermogravimetric measurements. **Thermochemica Acta**, v. 102, p. 125–135, 1986.

116 MISHRA, S. K.; KANUNGO, S. B. Thermal dehydration and decomposition of nickel chloride hydrate ( $\text{NiCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ). **Journal of Thermal Analysis**, v. 38, n. 11, p. 2417–2436, 1992.

117 NEGREA, D. et al. Microstructural characterization of hydroxyapatite-alendronate nanocomposites. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 12, n. 5, p. 1194–1199, 2010.

118 AFERGAN, E. et al.  $^{31}\text{P}$ -NMR and differential scanning calorimetry studies for determining vesicle's drug physical state and fraction in alendronate liposomes. **Journal of Bioanalysis and Biomedicine**, v. 2, n. 6, p. 125–131, 2010.

119 NAIR, B. P.; SINDHU, M.; NAIR, P. D. Polycaprolactone-laponite composite scaffold releasing strontium ranelate for bone tissue engineering applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 423–430, 2016.

120 LOCA, D. et al. Development of local strontium ranelate delivery systems and long term in vitro drug release studies in osteogenic medium. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

121 SMIRNOVA, A. et al. Encapsulation of Strontium Ranelate in Poly(Lactic Acid) Matrix. **Key Engineering Materials**, v. 721, p. 208–212, 2016.

122 FU, Y.; KAO, W. J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429–444, 2010.

123 KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25–35, 1983.

124 L. RITGER, P.; A. PEPPAS, N. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37–42, 1987.

125 DASH, S. et al. Kinetic Modeling on Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

126 MARAKA, S.; KENNEL, K. A. Bisphosphonates for the prevention and treatment of Osteoporosis. **BMJ**, v. 351, 2015.