

TACIANE PEREIRA DA COSTA

**BIOCERÂMICA POROSA COM LIBERAÇÃO DE FÁRMACO PARA O
TRATAMENTO DE OSTEOPOROSE.**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo F. C. Marques
Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

C837b Costa, Taciane Pereira da
Biocerâmica porosa com liberação de fármaco para o
tratamento de osteoporose / Taciane Pereira da Costa. –
Araraquara : [s.n.], 2017
170 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

Coorientador: Miguel Jafelicci Junior

1. Apatita. 2. Alendronato. 3. Copolímeros bloco.
4. Tecnologia de liberação controlada. 5. Osteoporose.
I. Título.

TACIANE PEREIRA DA COSTA

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

Araraquara, 28 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Prof.ª. Dr.ª Sandra Helena Pulcinelli
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Prof.ª. Dr.ª. Eliana Cristina da Silva Rigo
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, Pirassununga – SP



Prof.ª. Dr.ª. Ana Paula Ramos
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto – SP



Prof.ª. Dr.ª. Maria Gabriela Nogueira Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia – UNIFAL, Poços de Caldas – MG

Dados Curriculares

1. Dados Pessoais

Nome: Taciane Pereira da Costa

Nome em citações bibliográficas COSTA, T. P.; T. P. COSTA

Filiação: Givaldo Silva Costa e Edna Pereira da Costa

Nascimento: São Paulo/SP - Brasil

Endereço profissional: Rua Prof. Francisco Degni, 55

Quitandinha - Araraquara

14800-060, SP - Brasil

Telefone: (11) 33019776

Endereço eletrônico: e-mail para contato: taci.costa@yahoo.com.br

e-mail alternativo : tacy_mi@yahoo.com.br

2. Formação Acadêmica/Titulação

2013

Doutorado em Química (Físico-Química).

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

com período sanduíche em Institut de Bioenginyeria de Catalunya (Orientador : Elisabeth Engel - CsF - CNPq)

Título: Biocerâmica porosa com liberação de fármacos para o tratamento de osteoporose

Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

Co-orientador: Miguel Jafelicci Junior

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2010 - 2012

Mestrado em Química (Físico-Química).

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

Título: Síntese de hidroxiapatita porosa com nanopartículas de óxido de ferro, Ano de obtenção: 2012

Orientador: Miguel Jafelicci Junior

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005 - 2010

Graduação em Química Bacharelado.

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

Título: Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcóxissilanos para controle de densidade de amina.

Orientador: Miguel Jafelicci Junior

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

3. Produção bibliográfica

3.1 Artigos completos publicados em periódicos

1. RODRIGO, MARQUES; **TACIANE, COSTA**; MIGUEL, JAFELICCI
Hydroxyapatite scaffolds surface modified with Pluronic for delivery of antiosteoporotic drugs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. v.4, p.1 - 2, 2016.

2. SOUZA, M. A.; SANTOS, H. T.; PRETTI, T. S.; NASCIMENTO, A. C. G. G.; **COSTA, T. P.**; SANTOS, F. J.; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C.
Magnetic Nanoparticles Surface Modified with Biodegradable Polymers for Controlled Methotrexate Delivery in Cancer Therapy. *Journal of Nanopharmaceutics and Drug Delivery*. v.3, p.77 - 84, 2016.

3. FREITAS, JULIANA CRISTINA DE; BRANCO, ROGERIO MENDES; LISBOA, ISABELLA GARCIA OLIVEIRA; **COSTA, TACIANE PEREIRA DA**; CAMPOS, MARIA GABRIELA NOGUEIRA; JAFELICCI JÚNIOR, MIGUEL; MARQUES, RODRIGO FERNANDO COSTA
Magnetic Nanoparticles Obtained by Homogeneous Coprecipitation Sonochemically Assisted. *Materials Research*. v.18, p.220 - 224, 2015.

4. KOPP, WILLIAN; **DA COSTA, TACIANE P.**; PEREIRA, SANDRA C.; JAFELICCI JR, MIGUEL; GIORDANO, ROBERTO C.; MARQUES, RODRIGO F.C.; ARAÚJO-MOREIRA, FERNANDO M.; GIORDANO, RAQUEL L.C.
Easily handling penicillin G acylase magnetic cross-linked enzymes aggregates: Catalytic and morphological studies. *Process Biochemistry* (1991). v.49, p.38 - 46, 2014.

3.2 Artigos aceitos para publicação

1. RODRIGUEZ, A.F.R.; **COSTA, T.P.**; BINI, R.A.; FARIA, F.S.E.D.V.; AZEVEDO, R.B.; JAFELICCI, M.; COAQUIRA, J.A.H.; MARTINEZ, M.A.R.; MANTILLA, J.C.; MARQUES, R.F.C.; MORAIS, P.C.
Surface functionalization of magnetite nanoparticle: A new approach using condensation of alkoxy silanes. *PHYSICA B-CONDENSED MATTER*. 2017.

3.3 Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. **T. P. COSTA**; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C.
Biocerâmica bifásica com liberação de fármacos para o tratamento de osteoporose In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2014, Uberlândia.
Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB), 2014. p.1374 - 1377

3.4 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. AMANTEA, B. E.; PIAZZA, R. D.; CHACON, J. R. V.; SANTOS, C. C.; **COSTA, T. P.**; TOGNOLO, A. C. T.; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C.

Esterification influency in thermosensitive behavior of copolymers PNIPAM-co-PAA and PVCL-co-PAA In: The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials, 2017, Brotas.

The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials - NANOMAT. 2017.

2. **COSTA, T. P.**; AMANTEA, B. E.; ASSIS, D. R.; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C.

Porous hydroxyapatite scaffold nanostructured for potential application in drug delivery system In: The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials, 2017, Brotas.

The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials – NANOMAT. 2017.

3. **COSTA, T. P.**; PIAZZA, R. D.; ROCHA, C. O.; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C.

Porous hydroxyapatite scaffolds surface modified with Pluronic® for alendronate delivery In: 5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2017, Lisboa.

5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials. 2017.

4. ASSIS, D. R.; UHEYAMA, V. N.; SANTOS, C. C.; AMANTEA, B. E.; **COSTA, T. P.**; JAFELICCI JR, M.; DAVOLOS, M. R.

Silver nanoparticles synthesis in Langmuir films In: The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials, 2017, Brotas.

The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials – NANOMAT. 2017.

5. **T. P. COSTA**; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C.

Magnetic hydroxyapatite for osteocarcinoma hyperthermy and simultaneously new bone regeneration In: Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2015, Sitges.

Fourth Internacional Conference on Multifuncional, Hybrid and Nanomaterials. 2015.

6. FREITAS, J. C.; LEUPOLD, S.; CAMPOS, M. G. N.; MARQUES, R. F. C.; TOGNOLO, A. C. T.; **COSTA, T. P.**

Magnetic nanoparticles coated with polycaprolactone for controlled release of hydrophobic drugs In: Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2015, Sitges.

Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials. 2015.

7. TOGNOLO, A. C. T.; **COSTA, T. P.**; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C. Magnetic Nanoparticles: Surface modified with folic acid In: Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2015, Sitges.

Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials. 2015.

8. **COSTA, T. P.**; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C.

Pluronic® for alendronate delivery In: XIII Encontro SBPMat, 2014, João Pessoa.

XIII Encontro SBPMat. 2014.

9. **COSTA, T. P.**; MARQUES, R. F. C.; JAFELICCI JR, M.

Superparamagnetic porous hydroxyapatite for treatment of osteosarcoma In: XII Encontro SBPMat, 2013, Campos do Jordão.

XII Encontro SBPMat. 2013.

10. **COSTA, T. P.**; MARQUES, R. F. C.; JAFELLICI JUNIOR, M.

Hidroxiapatita porosa para aplicações em osteocarcinoma In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia.

Hidroxiapatita porosa para aplicações em osteocarcinoma. 2012.

11. **COSTA, T. P.**; MARQUES, R. F. C.; JAFELLICI JUNIOR, M.

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcóxissilanos para controle de densidade de amina In: XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2009, São José do Rio Preto.

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcóxissilanos para controle de densidade de amina. 2009.

12. **COSTA, T. P.**; MARQUES, R. F. C.; JAFELLICI JUNIOR, M.

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcóxissilanos para controle de densidade de amina In: XX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2008, São José dos Campos.

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcóxissilanos para controle de densidade de amina. 2008.

3.5 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. MARQUES, R. F. C.; **COSTA, T. P.**; VARANDA, L. C.; SILVA, N. J. J.; SANTOS, F. J.; MILAN, A.; JAFELICCI JR, M.

Magnetite nanoparticles tailored with folic acid through modulated surface amine group density In: VI Encontro SBPMat 2007, 2007, Natal.

Abstracts. 2007. p.D579

3.5 Apresentação de trabalho e palestra

1. **COSTA, T. P.**

Scaffold for bisphosphonate delivery, 2015. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

2. COSTA, T. P.; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C.
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina. 2009. (Congresso ,Apresentação de Trabalho)

3. **COSTA, T. P.**; BINI, R. A.; MARQUES, R. F. C.; JAFELICCI JR, M.
Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro: Funcionalização de Superfície com Alcoxissilanos para Controle de Densidade de Amina, 2008. (Outra, Apresentação de Trabalho)

4. COSTA, T. P.; JAFELICCI JR, M.; MARQUES, R. F. C.
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina. 2008. (Congresso ,Apresentação de Trabalho)

4. Eventos

4.1 Participação em eventos

1. Apresentação de Pôster/Painel na **Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials**, 2015. (Congresso)
Magnetic hydroxyapatite for osteocarcinoma hyperthermy and simultaneously new bone regeneration.

2. Conferencista no **Workshop Australia-UNESP**, 2015. (Outra)
Scaffold for bisphosphonate delivery.

3. Apresentação de Pôster/Painel no **XIII Encontro SBPMat**, 2014. (Congresso)
Plurionics® for alendronate delivery.

4. Apresentação de Pôster/Painel no **XII Encontro SBPMat**, 2013. (Congresso)
Superparamagnetic porous hydroxyapatite for treatment of osteosarcoma.

5. Apresentação Oral na **35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012. (Congresso)
Hidroxiapatita porosa para aplicações em osteocarcinoma.

6. Apresentação de Pôster/Painel na **35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012. (Congresso)
Hidroxiapatita porosa para aplicações em osteocarcinoma.

7. Apresentação de Pôster/Painel na **XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2009. (Congresso)
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina.

8. Apresentação de Pôster/Painel na **XX Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2008. (Congresso)
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina.

Dedico este trabalho a minha família e a todas as pessoas que me ajudaram de alguma maneira a finalizá-lo.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Rodrigo Costa Marques por todos esses anos de orientação, paciência, conselhos e pela oportunidade de aprendizado.

Ao Professor Dr. Miguel Jafelicci Junior, pela ajuda e ensinamentos.

A todos os colegas do Laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides pelo suporte e convivência: Carol Telatin, Carol Rocha, Caio, Rodolfo, Jaime, Luisa, João Schiavon e João Brandt. E aqueles que já saíram de lá: Maria, Juliana e Vlad.

Aos meus amigos Douglas e Bruno de Araraquara, pelo apoio, amizade, companheirismo, nos bons e maus momentos.

A minha família, especialmente minha mãe que sempre me dá suporte em tudo e minha irmã pelos momentos de diversão.

Ao Instituto de Bioengenharia da Catalunha (IBEC), principalmente a Prof^a Dr^a. Elisabeth Engel por ter me aceitado em seu laboratório para fazer meu doutorado sanduíche. E a todos do grupo Biomaterials for regenerative therapies: Soledad, Irene, Claudia, Pau, Joan, Jesús e Belén.

Ao Instituto de Química, pela infraestrutura e pela formação. E a todos os funcionários.

A Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho *scaffolds* de hidroxiapatita (HA) foram sintetizados e sua superfície modificada com uma matriz polimérica (copolímero tribloco óxido de polipropileno e óxido de polietileno - PEO-PPO *Pluronic*[®]), na qual o fármaco alendronato (AL) foi incorporado, visando à liberação controlada de fármaco e o uso deste biomaterial como substituto ósseo para pessoas com osteoporose. Em uma primeira etapa, o método da dispersão sólida foi utilizado para preparar compósitos de *Pluronic*[®] e alendronato. Por meio das análises de difratometria de raios X e calorimetria exploratória diferencial (DSC) chegou-se à conclusão que a melhor amostra foi a F108AL2, que indicava uma melhor interação do polímero com o alendronato. Na segunda etapa, um *template* de sacrifício de esferas de sílica foi utilizado para preparar a HA porosa. As duas amostras obtidas HA200 e HA400 com tamanho de poros médios de 170nm e 350nm respectivamente foram utilizadas para sintetizar amostras de hidroxiapatita porosa com alendronato, baseando-se nas interações intermoleculares entre os íons cálcio da hidroxiapatita com os íons fosfato e amina do fármaco. As análises de espectroscopia na região do infravermelho e DSC indicaram o sucesso na incorporação do fármaco na HA. Como última etapa, o biocompósito HA porosa - *Pluronic*[®] F108 - AL foi preparado. As análises de IV, DSC e microscopia eletrônica de varredura indicaram o sucesso na modificação da superfície da HA com o polímero, bem como a presença do alendronato. Para as amostras de todas as etapas foram realizadas curvas de liberação do AL. Nas amostras *Pluronic*[®]-AL, o máximo de liberação foi alcançado em 120 min, com a amostra F108AL2 apresentando o melhor resultado. Já nas amostras HA-AL, mais de 80% do fármaco foi incorporado nas amostras porosas e 24% foi o máximo de liberação alcançado em 72h. Nas amostras do biocompósito HA-F108-AL, o melhor resultado foi observado para a amostra F108HA400AL que apresentou um comportamento distinto das outras, alcançando um máximo de liberação de 80% em 100 minutos. Após a síntese e caracterização dos biocompósitos, a segunda parte deste trabalho foi focada nos testes *in vitro*. Devido à falta de estabilidade no meio de cultura não foi possível realizar os testes nas amostras HA-F108-AL. Novas amostras foram preparadas baseadas em discos de hidroxiapatita preparados com a amostra HA400. O alendronato foi incorporados nesses discos com duas concentrações diferentes, 0,1mg e 1,0mg. Para as amostras HA, HAAL-0,1 e HAAL-

1,0 foram realizados ensaios com osteoclastos. Os testes de atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente e alamar blue[®] mostraram uma menor presença dos osteoclastos nas amostras com maior concentração de alendronato. Com os resultados positivos, um novo biocompósito foi preparado a partir de um gel formado de Pluronic[®] F127 e alginato juntamente com os discos de HA, duas amostras foram sintetizadas HAGEL e HAGELAL com incorporação de alendronato. Para os ensaios dessas amostras dois tipos de células foram utilizadas, uma co-cultura de osteoclastos e fibroblastos e células mesenquimais. O teste de atividade da fosfatase alcalina com as células mesenquimais indicou que as amostras poderiam estar induzindo à diferenciação destas em osteoblastos, principalmente a amostra HAGELAL. Os resultados indicam um bom potencial dos biocompósitos para uso como substituto ósseo para pessoas com osteoporose.

Palavras chave: Hidroxiapatita, alendronato, tribloco PEO-PPO-PEO, liberação de fármaco.

ABSTRACT

In this work, hydroxyapatite (HA) scaffolds with surface modified by a triblock copolymer polypropylene oxide and polyethylene oxide (PEO-PPO - Pluronic®) matrix were synthesized for use as alendronate (AL) releaser, with aim to use this biomaterial as a bone graft for people with osteoporosis. In a first step, the solid dispersion method was used to prepare *Pluronic*® and AL composites and, through X-ray diffractometry and differential scanning calorimetry (DSC) analyzes, F108AL2 was found as the best sample with better interaction between the polymer and AL. In the second step, the porous HA was prepared by a silica spheres sacrificial template. The two samples obtained HA200 and HA400 with average pore size of 170nm and 350nm respectively were used to synthesize HA-AL samples, based on the intermolecular interactions between the HA calcium ions with the AL phosphate and amine ions. Infrared spectroscopy (IR) and DSC analyzes indicated success in drug incorporation. As the last step, the porous HA-Pluronic® F108-AL biocomposite was prepared. Scanning electron microscopy, IV and DSC analyzes indicated the success in the HA's surface modification with the polymer as well as the presence of AL. After the samples characterization of all steps, it was performed AL release curves. In the *Pluronic*®-AL samples, maximum release was achieved in 120 min, with the F108AL2 sample showing the best result. In the HA-AL samples, more than 80% of the drug was incorporated in the porous samples and 24% was the maximum release reached in 72h. In the HA-F108-AL biocomposite samples, F108HA400AL showed the best result, it was observed a distinct behavior, reached a maximum release of 80% in 100 minutes and remained constant. After the synthesis and characterization of the biocomposites, the second part of this work was focused on the *in vitro tests*. Due to the lack of stability in the culture medium, the HA-F108-AL samples could not be tested. New samples were prepared based on hydroxyapatite disks prepared with the HA400 sample. Alendronate was incorporated into these disks with two different concentrations, 0.1mg and 1.0mg. For the HA, HAAL-0.1 and HAAL-1.0 samples, osteoclast assays were performed, tartarato-resistant acid phosphatase activity and alamar blue tests showed a lower presence of osteoclasts in the samples with higher concentration of alendronate. From the positive results, a new biocomposite was prepared based in a gel formed of Pluronic® F127 and alginate with the HA disks, two samples were synthesized HAGEL and HAGELAL

with incorporation of alendronate. Two cells types were used for the assays, a co-culture of osteoclasts and fibroblasts and mesenchymal cells. The alkaline phosphatase activity test with the mesenchymal cells indicated that the samples could be inducing the differentiation of these into osteoblasts, especially the sample HAGELAL (containing AL). The result indicate a good potential of the biocomposites as a bone graft for people with osteoporosis.

Keywords: Hydroxyapatite, alendronate, PEO-PPO-PEO triblock, drug release.

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema do biocompósito hidroxiapatita porosa-polímero-fármaco.....	28
Figura 2 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita e algumas das substituições iônicas mais comuns que ocorrem na cela unitária.....	37
Figura 3 - Estrutura da hidroxiapatita projetada no plano x, y.	40
Figura 4 - Esquema de preparação da hidroxiapatita porosa utilizando um molde empacotado de esferas de sílica.....	45
Figura 5 - Estrutura molecular genérica dos <i>Pluronic</i> [®]	46
Figura 6 - Equações que representam a síntese dos copolímeros PEO-PPO-PEO.	47
Figura 7 - Estrutura do pirofosfato.....	48
Figura 8 - Estrutura genérica dos bisfosfonatos.....	50
Figura 9 - (a) Endocitose do bisfosfonato pelos osteoclastos a partir da superfície óssea, (b) Mecanismo de ação dos bisfosfonatos contendo nitrogênio, estes inibem seletivamente a farnesil pirofosfato sintase de (FPPS) nos osteoclastos, o que interrompe a via do mevalonato.	51
Figura 10 - Níveis de fármaco no plasma liberado pelo sistema de liberação tradicional, uma combinação de múltiplas cápsulas orais ou dose de injeção (curva tracejada azul) e sistema de liberação controlada (curva contínua vermelha).....	57
Figura 11 - Classificação de sistemas de liberação controlada por difusão de acordo com sua estrutura física e método de encapsulamento dos fármacos.....	58
Figura 12 - Esquema dos sistemas de liberação controlada por dissolução.	59
Figura 13 - Esquema de um sistema de liberação controlada por erosão.....	60
Figura 14 - Esquema da síntese das matrizes poliméricas com alendronato.....	64
Figura 15 - Esquema da síntese das esferas de sílica.....	65
Figura 16 - Esquema da preparação do molde de esferas de sílica.....	66
Figura 17 - Esquema da síntese do gel precursor de HA.....	66
Figura 18 - Esquema da síntese da HA porosa.....	67
Figura 19 - Esquema da preparação do compósito hidroxiapatita-alendronato.	68
Figura 20 - Esquema da síntese do compósito HA-polímero-AL.....	69

Figura 21 - Possível mecanismo de reação entre o alendronato e a ninidrina.	70
Figura 22 - (a) estrutura molecular do alendronato e (b) estrutura molecular genérica dos copolímeros de PEO/PPO.....	75
Figura 23 - Espectro de absorção na região do infravermelho do alendronato, polímeros F68, F108 e F127 e das amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2.	77
Figura 24 - Micrografias eletrônicas de varredura do alendronato (a), (b) e (c) amostra F68AL2 (d), (e) e (f), amostra F108AL2 (g), (h) e (i) e amostra F127AL2 (j), (l) e (m).	79
Figura 25 - Difratogramas de raios X das amostras alendronato, F68AL2, F108AL2 e F127AL2.	80
Figura 26 - Difratogramas de raios X das amostras alendronato, F68AL2, F108AL2 e F127AL2 sobrepostos e na faixa entre 5 a 20° 2 θ	81
Figura 27 - Curvas de DSC das amostras alendronato, F68, F68AL2, F108, F108AL2, F127, F127AL2.	83
Figura 28 - Curva de calibração do alendronato.....	86
Figura 29 - Curvas de liberação das amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2.	87
Figura 30 - Curvas da fração de fármaco liberado (M_t/M_∞) em função do tempo das amostras F68AL2, F108AL2, F127AL.....	88
Figura 31 - Micrografias eletrônicas de varredura e histograma da amostra S400. .	92
Figura 32 - Micrografias eletrônicas de varredura e histograma da amostra S200. .	92
Figura 33 - Difratograma de raios X da amostra S400.	93
Figura 34 - Micrografias eletrônicas de varredura da amostra (a) TP400 e (b) TP200.	94
Figura 35 - Micrografias eletrônicas de varredura das amostras (a) HA400 e (b) HA200.....	95
Figura 36 - Difratograma de raios X da amostra HA400 antes da remoção e depois da remoção das esferas de sílica, da amostra HAP e o padrão de difração de raios X da fase HA.....	96
Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras alendronato, HA400, HA400AL, HA200, HA200AL, HAP e HAPAL.	98
Figura 38 - Curvas de DSC das amostras alendronato, HA400, HA400AL, HA200 e H200AL HAP e HAPAL.	101

Figura 39 - Curvas de liberação das amostras HA400AL, HA200AL e HAPAL.....	104
Figura 40 - Curvas da quantidade de fármaco liberado (Q_t) em função da raiz quadrada do tempo das amostras HAPAL, HA200 e HA400.	104
Figura 41 - Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras alendronato, HA400, HA200, HAP, F108 e F108HA400AL, F108HA200AL e F108HAPAL.	106
Figura 42 - Micrografias eletrônicas de varredura da amostra F108HA400AL.....	108
Figura 43 - Micrografias eletrônicas de varredura da amostra F108HA200AL.....	108
Figura 44 - Micrografias eletrônicas de varredura da amostra F108HAPAL.....	109
Figura 45 - Curvas de DSC das amostras alendronato, HA400, HA200, HAP, F108, F108HA400AL, F108HA200AL, F108HAPAL.	110
Figura 46 - Curvas de liberação das amostras F108HA400AL, F108HA200AL e F108HAPAL.	112
Figura 47 - Curvas da fração de fármaco liberado (M_t/M_∞) em função do tempo das amostras F108HA400AL, F108HA200AL, F108HAPAL.	113
Figura 48 - Estrutura do ALG: (a) monômeros, (b) conformação da cadeia e (c) distribuição de blocos.....	120
Figura 49 - Hidrogel de alginato preparado por reticulação iônica (modelo da caixa de ovo).	121
Figura 50 - Fotografia do molde de teflon utilizado para a preparação dos discos de HA.	124
Figura 51 - Esquema da preparação do compósito HAAL.	125
Figura 52 - Esquema da síntese do gel alginato- <i>Pluronic</i> [®]	125
Figura 53 - Esquema de preparação do compósito HAGEL e HAGELAL.	126
Figura 54 - Fotografias do procedimento de isolamento dos osteoclastos (a) e (b).....	128
Figura 55 - O <i>alamar blue</i> [®] não reduzido corresponde à resazurina, e reduzido corresponde a resorufina.	131
Figura 56 - Estrutura do DAPI.	135
Figura 57 - Estrutura do vermelho de alizarina.....	135

Figura 58 - Fotografia do biocompósito hidroxiapatita- <i>Pluronic</i> ®-AL após 24h incubadas no meio de cultura.....	137
Figura 59 - Fotografia do disco de hidroxiapatita preparado com o molde de teflon.....	138
Figura 60 - Fotografia do disco de hidroxiapatita após sete dias incubado com meio de cultura.	138
Figura 61 - Micrografias de fluorescência dos osteoclastos com faloidina e DAPI (a) e (b).	139
Figura 62 - Micrografia dos osteoclastos coloridos para TRAP.....	140
Figura 63 - Micrografia dos osteoblastos após 2 dias de cultivo.	140
Figura 64 - Micrografias dos osteoclastos (controle placa com revestimento de fosfato de cálcio) (a) coloridos para <i>TRAP</i> e (b) com fluorescência DAPI.	142
Figura 65 - Curva de calibração <i>alamar blue</i> ®.	143
Figura 66 - Resultado da viabilidade celular.....	143
Figura 67 - Micrografias dos fibroblastos (a) e (c) cultivados com o meio de cultura das amostras e (b) e (d) com o meio de cultura normal (controle).	144
Figura 68 - Fotografia da placa de cultivo dos osteoblastos após o ensaio de vermelho de alizarina.	145
Figura 69 - Micrografias após 21 dias de cultivo no meio osteogênico (a) dos osteoblastos (b) da matriz extracelular.....	146
Figura 70 - Fotografia das amostras de hidroxiapatita após um dia de cultivo com as células e coloridas com azul de metileno.....	146
Figura 71 - Micrografias das amostras de hidroxiapatita com as células coloridas para <i>TRAP</i>	147
Figura 72 - Micrografias das amostras com as células coloridas para <i>TRAP</i> (a) HAAL-0,1 e (b) HAAL1,0.....	148
Figura 73 - Resultado da viabilidade celular dos osteoclastos	148
Figura 74 - Micrografias de fluorescência dos biocompósitos HAGEL com faloidina (a) e (b).	150
Figura 75 - Micrografias de fluorescência dos controles com faloidina e DAPI após seis dias de cultivo com co-cultura fibroblastos/osteoclastos (a) e (b).	151

Figura 76 - Micrografias eletrônicas de varredura dos biocompósitos HAGEL após 6 dias de cultivo com co-cultura fibroblastos/osteoclastos (a),(b),(c) e (d).	152
Figura 77 - Micrografias eletrônicas de varredura dos biocompósitos HAGELAL após seis dias de cultivo com co-cultura fibroblastos/osteoclastos (a), (b), (c) e (d).....	153
Figura 78 - Resultado da atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente.....	154
Figura 79 - Curva de calibração ALP.....	155

Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação das biocerâmicas.....	34
Tabela 2 - Propriedades requeridas aos fosfatos de cálcio para aplicações médicas.....	35
Tabela 3 - Ortofosfatos de cálcio ordenados por sua razão Ca/P.....	38
Tabela 4 - Vantagem e desvantagem de diferentes métodos de produção de HA...43	
Tabela 5 - <i>Pluronic</i> [®] e suas propriedades.....	47
Tabela 6 - Diferentes bisfosfonatos e suas potências relativas a reabsorção óssea	50
Tabela 7 - Reagentes utilizados nos experimentos.	63
Tabela 8 - Características dos <i>Pluronic</i> [®] utilizados no experimento.	64
Tabela 9 - Características das amostras preparadas.	64
Tabela 10 - Características das amostras preparadas.	68
Tabela 11 - Características das amostras de biocompósitos preparadas.....	69
Tabela 12 - Atribuição dos eventos térmicos para as diferentes amostras.....	84
Tabela 13 - Valores obtidos a partir do ajuste linear do gráfico $\log (M_t/M_\infty) \times \log (t)$.	89
Tabela 14 - Atribuição dos principais picos observados no difratograma de raios X da amostra HA400.	97
Tabela 15 - Atribuição dos eventos térmicos para as diferentes amostras de HA porosa-AL.....	102
Tabela 16 - Quantidade de alendronato incorporada nas amostras.	103
Tabela 17 - Atribuição dos eventos térmicos para as diferentes amostras de HA porosa-polímero-AL.....	111
Tabela 18 - Valores obtidos a partir do ajuste linear do gráfico $\log (M_t/M_\infty) \times \log (t)$	113
Tabela 19 - Reagentes utilizados nos experimentos.	123
Tabela 20 - Meios de cultura utilizados durante os experimentos.	127
Tabela 21 - Resultados atividade da fosfatase alcalina.....	155

Lista de abreviaturas e siglas

AL	alendronato
ALG	alginato
ALP	fosfatase alcalina
BP	bisfosfonatos
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DLS	espalhamento de luz dinâmico
DRX	difratometria de raios X
DSC	calorimetria exploratória diferencial
HA	hidroxiapatita
HLB	balanços lipofílicos-hidrofílicos
IV	espectroscopia na região do infravermelho
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MSCs	células mesenquimais
PEO-PPO	óxido de polietileno e óxido de polipropileno
PVP	polivinilpirrolidina
TEOS	tetraetilortossilicato
TRAP	fosfatase ácida tártaro-resistente
β -TCP	β fostato tricálcico
TMF	trimetilfosfato

Sumário

1. Introdução	25
2. Revisão da Literatura	30
2.1 Substitutos ósseos.....	30
2.2 Biocerâmicas	32
2.2.1 Fosfatos de Cálcio.....	34
2.2.1.2 Hidroxiapatita.....	39
2.2.1.3 Fosfatos de cálcio porosos	43
2.3 Modificação com polímero - <i>Pluronic</i> [®]	45
2.4 Bisfosfonatos - Alendronato.....	48
3. Objetivos	53
Capítulo I - Síntese e caracterização dos biocompósitos de hidroxiapatita porosa modificados com <i>Pluronic</i> [®] para a liberação de alendronato.....	54
1. Introdução - Objetivos	55
2. Revisão da literatura	56
2.1 Liberação controlada de fármacos.....	56
2.1.1 Modelos de cinética de liberação	61
3. Parte Experimental	63
3.1 Reagentes e materiais.....	63
3.2 Preparação da matriz polimérica com incorporação de alendronato	63
3.3 Preparação do compósito hidroxiapatita-alendronato.....	65
3.3.1 Preparação do molde de esferas de sílica	65
3.3.2 Preparação do molde (<i>scaffold</i>) de hidroxiapatita porosa	66
3.3.3 Preparação do compósito hidroxiapatita-alendronato	67
3.4 Preparação do compósito hidroxiapatita-polímero-alendronato.....	68
3.5 Ensaio de liberação de fármaco - determinação do alendronato pelo método da ninidrina	69
3.5.1 Construção da curva de calibração	70
3.5.2 Determinação da quantidade de alendronato incorporada na hidroxiapatita	70
3.5.3 Curva de liberação matriz polimérica-alendronato, hidroxiapatita-alendronato e hidroxiapatita-polímero-alendronato.....	71
3.6 Técnicas de caracterização	71
3.6.1 Difractometria de raios X (DRX).....	71
3.6.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	72
3.6.3 Espectroscopia na região do infravermelho	73

3.6.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	73
3.6.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	74
4. Resultados e discussão.....	75
4.1 Obtenção e caracterização das matrizes poliméricas com alendronato	75
4.1.1 Introdução	75
4.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho	76
4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura	78
4.1.4 Difractometria de Raios X	80
4.1.5 Calorimetria exploratória diferencial.....	82
4.1.6 Curvas e cinética de liberação do alendronato	86
4.2 Obtenção e caracterização do compósito hidroxiapatita porosa - alendronato.....	90
4.2.1 Introdução	90
4.2.2 Obtenção e caracterização das hidroxiapatitas porosas	91
4.2.2.1 Síntese e caracterização das esferas de sílica e molde de esferas de sílica	91
4.2.2.2 Caracterização das HA porosas	94
4.2.3 Caracterização do compósito hidroxiapatita-alendronato.....	97
4.2.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	97
4.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial	100
4.2.3.3 Curvas e cinética de liberação do alendronato.....	102
4.3 Obtenção e caracterização do compósito hidroxiapatita porosa - <i>Pluronic</i> [®] - alendronato.....	105
4.3.1 Introdução	105
4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho	105
4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura	107
4.3.4 Calorimetria diferencial exploratória.....	109
4.3.5 Curvas e cinética de liberação do alendronato	112
5. Conclusões.....	115
Capítulo II - Ensaios in vitro.....	117
1. Introdução - Objetivos	118
2. Revisão da Literatura	119
2.1 Alginato.....	119
3. Procedimento Experimental	123
3.1 Reagentes e materiais.....	123
3.2 Preparação dos discos de hidroxiapatita	124

3.3	Preparação do compósito hidroxiapatita-alendronato.....	124
3.4	Preparação do gel alginato- <i>Pluronic</i> [®]	125
3.5	Preparação do compósito hidroxiapatita-gel-alendronato.....	126
3.6	Esterilização das amostras.....	126
3.7	Procedimentos com células.....	127
3.7.1	Meios de cultura.....	127
3.7.2	Isolamento osteoclastos.....	127
3.7.3	Isolamento osteoblastos.....	128
3.7.4	Fibroblastos e células mesenquimais.....	129
3.7.5	Tripsinização e criopreservação.....	129
3.7.6	Semeadura das células nas amostras.....	130
3.7.7	Ensaio.....	130
3.7.7.1	Viabilidade celular - Alamar blue [®]	130
3.7.7.2	Atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP).....	132
3.7.7.3	Atividade da fosfatase alcalina (ALP).....	132
3.7.7.4	Ensaio colorimétrico (Staining assays).....	133
3.7.7.4.1	Fixação das células.....	133
3.7.7.4.2	Fosfatase ácida tartarato-resistente (<i>TRAP</i>) <i>staining</i>	134
3.7.7.4.3	DAPI.....	134
3.7.7.4.4	Faloidina (verde).....	135
3.7.7.4.5	Vermelho de Alizarina.....	135
3.7.8	Microscopia eletrônica de varredura de amostras biológicas.....	136
4.	Resultados e discussão.....	137
4.1	Teste de estabilidade do biocompósito Hidroxiapatita- <i>Pluronic</i> [®] -alendronato.....	137
4.2	Primeiro isolamento de osteoclastos e osteoblastos.....	139
4.3	Discos hidroxiapatita-alendronato.....	141
4.4	Biocompósito Gel Alginato- <i>Pluronic</i> [®] e disco hidroxiapatita.....	149
5.	Conclusões.....	156
	Referências.....	157

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O osso é a unidade básica do sistema esquelético humano (1). Os esqueletos adultos contem 206 ossos, e cada osso mantém sua forma e estrutura durante a vida de um indivíduo, através de um processo contínuo de remodelação (2). O osso fornece estrutura para o corpo, protege os órgãos vitais, suporta movimentos mecânicos, hospeda células hematopoiéticas e mantém a homeostase do ferro. O osso tem um arranjo complexo e variável de estruturas em grandes escalas de comprimento, o que, em conjunto, possibilita diversas funções mecânicas, biológicas e químicas (1).

O osso é composto de uma matriz extracelular (90%) e água (10%). A matriz extracelular é constituída por materiais orgânicos e inorgânicos. O material orgânico dá aos ossos a sua flexibilidade, enquanto o material inorgânico a sua resiliência. O material inorgânico, geralmente constituído de hidroxiapatita, é a porção principal da matriz extracelular que consiste em cerca de 60-70% da massa óssea. Os restantes 30-40% são componentes orgânicos que consistem em 90% de colágeno tipo I e proteínas não colágenas. A rede de colágeno consiste em fibras ou feixes paralelos bem organizados (2). O número e a distribuição das fibrilas de colágeno (diâmetro médio = 100nm) no tecido geralmente determinam o seu estado de mineralização (3). Os minerais são os principais componentes do osso, onde 70% do seu peso (50% em volume) são feitos de cristais de fosfato de cálcio (principalmente hidroxiapatita) com um tamanho inferior a 200Å. São os minerais que proporcionam rigidez e força para as funções de suporte esquelético (4).

Apesar do osso ser uma estrutura rígida, ele não é um tecido inerte. Quatro células distintas realizam a formação local, reabsorção e manutenção do osso: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células do revestimento ósseo (4). Osteoblastos são células formadoras de ossos que possuem apenas um núcleo. Eles estão localizados ao longo da superfície óssea e compreendem 4%-6% das células ósseas totais. Os osteoblastos são originários da diferenciação de células osteogênicas, dos tecidos que cobrem o exterior do osso, e da medula óssea (1). A síntese da matriz óssea por osteoblastos ocorre em duas etapas principais: deposição de matriz orgânica e sua posterior mineralização (5). Uma vez que o osteoblasto termina seu trabalho, ele é preso dentro do osso e se endurece. Quando

presos nos ossos, os osteoblastos passam a ser chamados de osteócitos. Assim, os osteócitos são células ósseas maduras. Eles estão dispersos na matriz óssea e supostamente atuam como sensores de estresse. Outros osteoblastos permanecem na parte superior dos ossos novos e são usados para proteger os ossos subjacentes, estes passam a ser conhecidos como células de revestimento. As células de revestimento ósseo possuem organelas planas para que elas possam facilmente cobrir o osso sem interferir com outras funções celulares. Os osteoclastos são células multinucleadas gigantes que são responsáveis pela reabsorção óssea (1). A ativação dos osteoclastos para iniciar a reabsorção óssea exige que ele se associe à superfície óssea, onde a actina e as integrinas desempenham um papel importante (6). Pode-se destacar também a membrana ondulada (*ruffled border*) (4) que corresponde à área central da membrana plasmática altamente invaginada responsável pela reabsorção óssea.

Dentre as doenças mais comuns que afetam os ossos, a osteoporose se apresenta como um grande e crescente problema de saúde em todo o mundo (7). Osteoporose é uma condição metabólica que se caracteriza pela diminuição progressiva da densidade óssea e aumento do risco de fraturas (8). A maioria dos pacientes são assintomáticos até que uma fratura ocorra, mais comumente na espinha, no rádio distal ou no joelho. Alguns pacientes podem apresentar também perda de altura e dor nas costas devido ao colapso vertebral (9).

Os ossos estão em constante processo de renovação, com os osteoclastos encarregadas de reabsorver as áreas envelhecidas e os osteoblastos produzindo novos ossos. Esse processo permanente e constante possibilita a reconstituição do osso quando ocorrem fraturas e explica por que a mais ou menos a cada dez anos o esqueleto humano se renova por inteiro (4,6). Com o tempo, porém, a absorção das células velhas aumenta e a formação de novas células ósseas diminui. O resultado é que os ossos se tornam mais porosos e perdem resistência. Na maioria dos casos, a osteoporose é uma condição relacionada com o envelhecimento. Ela pode manifestar-se em ambos os sexos, mas atinge especialmente as mulheres depois da menopausa por causa da queda na produção do estrogênio. A falta de estrogênio circulando no corpo aumenta a reabsorção óssea e diminui a formação de novos ossos (9).

É estimada que cerca de 125 milhões de pessoas na Europa, Índia, Japão e EUA têm osteoporose (7). Além disso, uma a cada três mulheres e um a cada cinco homens acima dos 50 anos irão sofrer uma fratura relacionada a esta doença (10,11). Nas mulheres acima de 45 anos, a osteoporose representa mais dias de hospitalização do que a diabetes, os ataques cardíacos ou o câncer de mama (12). O custo anual estimado da osteoporose é de cerca de 37 bilhões de euros na Europa e 19 bilhões de dólares nos EUA (12,13). A osteoporose também tem acentuada incidência sobre os brasileiros, cerca de 10 milhões de pessoas possuem a doença no país (14,15). Pesquisas mostram que a taxa de mortalidade, no primeiro ano depois da fratura de quadril é 23,2%, e estas geram um custo de 6 milhões de dólares ao ano para a companhias seguradoras de saúde privadas (16). Em muitos países da América Latina, o número de fraturas por osteoporose será mais do que o dobro em 2050. No mundo inteiro, 40% das fraturas osteoporóticas ocorrem em indivíduos em idade economicamente ativa. As cifras do custo direto das fraturas por osteoporose não levam em consideração os enormes custos indiretos para a economia, tais como a incapacidade e a perda de produtividade (12).

Atualmente, com o incremento da expectativa de vida da população e as mudanças no estilo de vida, sobre tudo da população feminina, os casos de osteoporoses têm aumentado significativamente e espera-se que aumentem drasticamente nas próximas décadas. Nesse cenário o desenvolvimento de biocompósitos com agentes antiosteoporóticos se torna muito desejável. Pessoas com osteoporose possuem baixa capacidade osteoregenerativa quando substitutos ósseos são aplicados. Desta forma, desenvolver um material capaz de liberar agentes antiosteoporóticos nos primeiros dias da regeneração óssea irá inibir os osteoclastos, favorecendo a ação de osteoblastos. Assim, substitutos ósseos modificados com polímeros para liberação controlada de fármacos pode ser uma excelente opção em tratamentos de pessoas com osteoporose. Este é o intuito deste trabalho: preparar um molde (*scaffold*) de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) porosa, um fosfato de cálcio já muito utilizada na engenharia de tecido ósseo (17,18) e modificar com um polímero anfifílico, nesse caso copolímeros em bloco de óxido de polietileno PEO (unidade hidrofílica) e óxido de polipropileno PPO (unidade hidrofóbica) (19,20) para a incorporação de um fármaco antiosteoporótico, visando

usar esse biocompósito como substituto ósseo para pessoas idosas com osteoporose. O fármaco escolhido, o alendronato (AL), tem seu efeito farmacológico relacionado à sua habilidade de ligar aos minerais ósseos e ao seu efeito bioquímico nas células, inibindo a ação dos osteoclastos, consequentemente a calcificação e reabsorção óssea (21). O esquema do biocompósito está ilustrado na Figura 1.

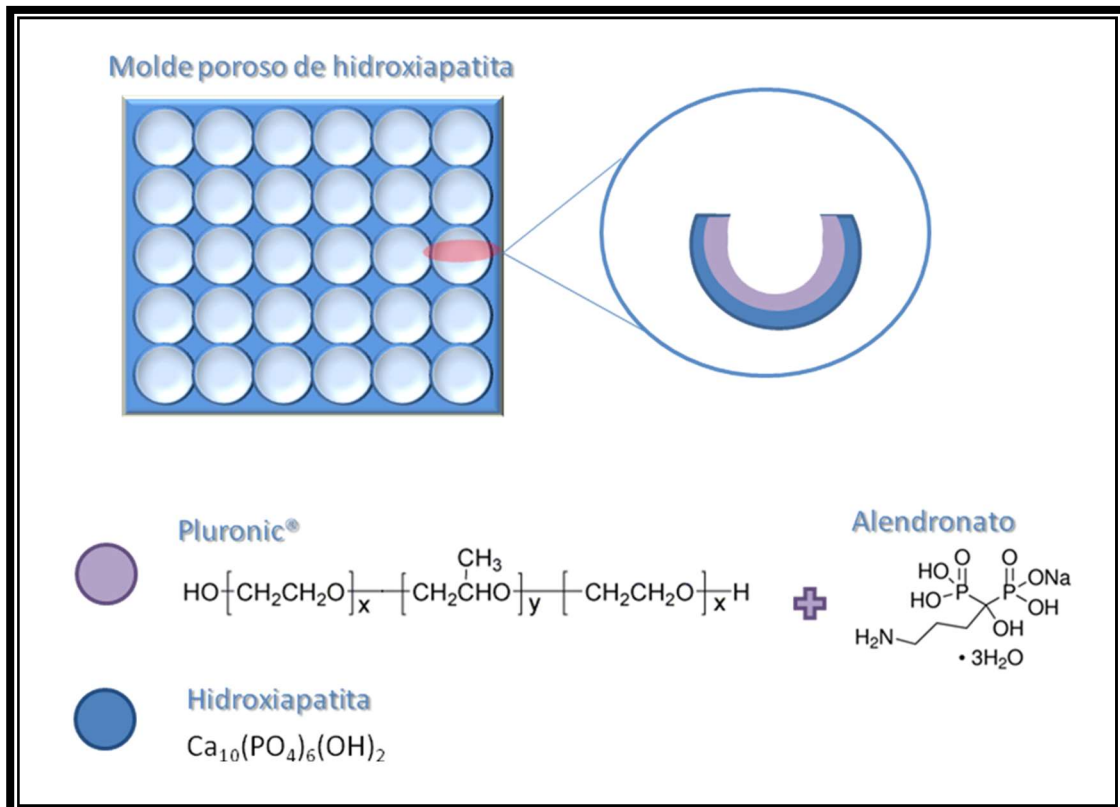


Figura 1 - Esquema do biocompósito hidroxapatita porosa-polímero-fármaco.
Fonte: Autor

O biocompósito é composto por uma matriz porosa de hidroxapatita que na Figura 1 está representada com a cor azul. A superfície desses poros seria modificada com o polímero já com o alendronato incorporado, representados com a cor roxa. O foco de aplicação desse material seriam em fraturas originadas pela osteoporose. Isso porque a ideia principal é inibir a ação dos osteoclastos em um primeiro momento, enquanto a hidroxapatita ajuda na indução da formação de novos tecidos ósseos o que é dificultado em pessoas com osteoporese. Apesar do foco específico, o biocompósito também poderia ser aplicado em qualquer tipo de defeito ósseo, por exemplo causado por um osteossarcoma.

*REVISÃO DA
LITERATURA*

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Substitutos ósseos

Substitutos ósseos não devem apenas preencher o tecido faltante, mas também, precisam imitar as propriedades naturais dos ossos. Devem fornecer uma matriz para o tecido hospedeiro se regenerar e se reparar. Esta tarefa deve ser feita fornecendo uma estrutura de suporte, onde o tecido hospedeiro e os vasos sanguíneos podem ser conectados e desenvolvidos. Em uma situação ideal, o substituto ósseo ou enxerto precisa ser ativo e capaz de interagir com o osso hospedeiro, para aumentar a proliferação e crescimento de células de osteoblastos. Com base nessas regras, as propriedades químicas e estruturais do tecido ósseo são as principais características que precisam ser sublinhadas (2,3).

Podemos definir como enxerto ósseo o transplante de ossos naturais ou sintetizados em um local danificado do osso para promover a regeneração do osso (2). Ao longo dos anos, um grande número de pesquisas e desenvolvimento de produtos, foram realizados no desenvolvimento de biomateriais para enxertos ósseos, mais confiáveis e biodegradáveis. Um marco significativo neste campo foi à obtenção de enxertos de biomateriais biodegradáveis, que podem se degradar ao longo do tempo e/ou reparar ou regenerar novos tecidos *in situ* ao longo do tempo. O conceito de implantes ósseos mudou ao longo dos anos, e a regeneração em vez da substituição, tem sido o foco principal das pesquisas nesse campo (2,22).

Mais de um milhão de cirurgias de implantes de enxertos ósseos ocorrem todos os anos (23). Os materiais autógenos (obtidos do próprio indivíduo), alógenos (obtidos de indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes), aloplásticos (materiais sintéticos produzidos em laboratório) e xenógenos (obtido de espécies diferentes, como de origem bovina) são as principais categorias de materiais que atualmente são utilizados para a substituição do defeito ósseo. Os materiais autógenos são obtidos principalmente do osso do hospedeiro por colheita direta (24). Os enxertos autógenos têm alguns atributos atraentes como: não ter problemas potenciais com o sistema imunológico; apresentar propriedades físico-químicas semelhantes aos ossos naturais; e possuírem propriedades osteogênicas resultando em uma criação muito mais fácil de novos ossos na região do enxerto

(24). No entanto, apenas alguns locais do corpo podem ser usados para o enxerto autógeno e, portanto, a limitação extrema desses enxertos é a principal desvantagem desse método. A forma natural dos ossos do doador também pode restringir suas aplicações. Além disso, existe o risco de infecção no local onde o osso é removido. O requisito de duas operações cirúrgicas tem seus próprios riscos como dor crônica, risco de contaminação, perda de sangue, lesão nervosa e arterial além de fraturas (25–27).

As limitações dos substitutos ósseos naturais alimentaram a busca de biocompósitos sintéticos alternativos e novos materiais ortobiológicos, para auxiliar na gestão de defeitos ósseos. As ligas metálicas (por exemplo, titânio, alumínio), polímeros (por exemplo, poli glicólico, poli lático), biopolímeros (por exemplo, fibroína de seda), hidroxiapatita e cerâmicas à base de fosfato são exemplos dos materiais sintéticos disponíveis que podem ser utilizados em biocompositos (28,29). As ligas metálicas, como o aço inoxidável e o titânio, podem fornecer propriedades de suporte satisfatórias e são amplamente utilizadas na cirurgia de fratura devido à facilidade de manuseio, custo relativamente baixo e alta disponibilidade. No entanto, problemas relacionados a alergias, infecções, reações tóxicas e proteções contra estresse devido às diferenças entre implante e osso são grandes inconvenientes. Além disso, a falta de osteocondução, osteoindução e compatibilidade com outros ossos são alguns dos principais problemas em suas aplicações (30).

Alguns enxertos à base de polímeros podem degradar e afetar a área do implante e conseqüentemente, pode ocorrer uma lise celular indesejável. Para resolver este problema e reforçar o material do implante, os enxertos com base em polímeros são normalmente incorporados com outros materiais, como a hidroxiapatita e o fosfato tricálcico que neutralizam as condições ácidas do ambiente devido às suas propriedades básicas (2,31). Os compostos de fosfato de cálcio são osteocondutores e biocompatíveis e podem ser usados sozinhos. Os enxertos que imitam as propriedades e a estrutura do osso natural são a melhor substituição para os tecidos defeituosos (32–34). Foi confirmado que a estrutura nano dos fosfatos de cálcio são cruciais para suas propriedades osteoindutivas (31). Os substitutos ósseos sintetizados não têm o risco de transmitir doenças, são fáceis de esterilizar e baratos em comparação com outras fontes naturais e de liga e possuem propriedades mecânicas ajustáveis e excelentes propriedades de crescimento (2).

2.2 Biocerâmicas

Há muitos milênios, a descoberta do fogo transformaria irreversivelmente a argila em cerâmica, e traria a sociedade agrária, enormes melhorias na qualidade, e expectativa de vida. Outra revolução ocorreu no uso da cerâmica nas últimas quatro décadas, também no sentido de melhorar a qualidade de vida da população. Esta revolução é o uso inovador de cerâmicas, especialmente projetadas para reparar, reconstruir e substituir partes do corpo doentes ou danificadas. Cerâmicas utilizadas para esse propósito são denominadas “biocerâmicas”(35). Podemos definir então biocerâmicas, como materiais cerâmicos projetados para atingir um comportamento fisiológico específico, para uso como material de construção em próteses ou órgãos internos artificiais (36).

A primeira definição de “biomateriais” que especificamente mencionou as “biocerâmicas” foi fornecida pelos Institutos Nacionais de Saúde durante uma conferência sobre as aplicações clínicas dos biomateriais nos EUA em 1982 (37): “Um biomaterial é qualquer substância, além de um fármaco, ou uma combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que pode ser utilizada por qualquer período de tempo, como um todo ou parte de um sistema que trata, amplia ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo”.

A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a década de 1890. A primeira biocerâmica amplamente testada foi o emplastro de Paris ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) (36). Pesquisadores formularam a hipótese de que, a implantação de sais minerais de cálcio e/ou fosfato em um defeito ósseo, estimularia o reparo ósseo, pois forneceriam minerais que poderiam ser incorporados no osso durante sua regeneração. Em 1892, Dreesman publicou o primeiro relatório do uso do gesso de Paris para preencher defeitos no osso (38). Devido à propriedades pouco atrativas, como baixa resistência mecânica e completa reabsorção pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação. Foi praticamente excluída a utilização do emplastro como biocerâmica implantável (39).

O estudo das biocerâmicas pode ser dividido em três gerações. Com o início em 1960, a primeira geração tinha como objetivo estudar e utilizar cerâmicas com a reatividade tão baixa quanto possível. Os exemplos mais representativos são a alumina (Al_2O_3) e a zircônica (ZrO_2). Elas são amplamente utilizadas como

biomateriais por causa de sua elevada resistência mecânica, excelente resistência à corrosão e desgaste, estabilidade, não toxicidade e biocompatibilidade in vivo(40).

A segunda geração iniciou-se nos anos 1980, o objetivo agora era obter interações favoráveis com o tecido vivo. Composições específicas de fosfatos ou sulfatos de cálcio, vidro bioativos, e vitro-cerâmicas são exemplos de biocerâmicas da segunda geração, utilizados clinicamente para preenchimento de tecido ósseo, cimento ósseo e revestimento de implantes metálicos. Na última década, foram necessárias biocerâmicas com propriedades mais exigentes. Os estudos da terceira geração são baseados mais em biologia e seguem o propósito de substituir os tecidos de “reposição” por tecidos “regeneradores”. Esta categoria inclui biocerâmicas baseadas em cerâmicas porosas de segunda geração, carreadoras de substâncias biologicamente ativas, além de materiais baseados em sílicas mesoporosas, vidros mesoporosos ordenados ou híbridos orgânico-inorgânicos (40).

Com o aumento no número de materiais cerâmicos utilizados como biomateriais e os diversos aspectos envolvidos na interação com os tecidos vivos, tem-se procurado classificá-los em diversos grupos. Assim, em termos gerais, as biocerâmicas podem ser classificadas em bioinertes e bioativas (39,41,42). Podemos classificar uma biocerâmica como bioinerte quando ela apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa ao redor do material (39). Como exemplos, podemos citar a alumina, zircônia e a titânia (41,42). Por outro lado, uma biocerâmica bioativa é definida como aquela que induz uma atividade biológica específica. Como exemplos destas últimas destacam-se a hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, o fosfato tricálcico $[Ca_3(PO_4)_2]$ e os biovidros. Outra classificação corrente é a estabelecida por Larry Hench (35,43) na qual as cerâmicas são agrupadas em 4 classes, de acordo com a resposta desenvolvida na interface tecido vivo/implante, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação das biocerâmicas (35,43).

Tipo de biocerâmica	Interações com os tecidos	Exemplos
Inertes	Não há interações químicas e nem biológicas	Alumina
Porosas	Ocorre o crescimento interno dos tecidos através dos poros	Aluminatos e hidroxiapatita porosos
Bioativas	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatita e vitro-cerâmicas
Reabsorvíveis	As cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos	Gesso e fosfato tricálcico

Fonte: HENCH (1998, 1706p.)(35), HENCH (1991, 1488p.)(43).

2.2.1 Fosfatos de Cálcio

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas (39). Elas são uma família de minerais extensivamente utilizada no campo de regeneração óssea, tanto em ortopedia quanto odontologia (1).

A aplicação dos fosfatos de cálcio para reparação e reconstrução de tecidos ósseos tem sido motivada pela sua similaridade química com o componente mineral dos ossos e dentes (44), o que ajuda a entender a sua biocompatibilidade. Alguns fosfatos de cálcio podem até ser integrados ao organismo vivo, seguindo um processo muito semelhante à remodelação óssea viva; esse processo é chamado osteointegração. Além disso, eles fornecem uma superfície adequada para orientar a remodelação óssea e direcionar o crescimento ósseo por um processo chamado osteocondução (45). Finalmente, existe ainda a possibilidade de produzir fosfatos de cálcio osteoindutivos por meio de substituições específicas, como por sílcio. A osteoindução é a propriedade exibida pelos materiais que estimula as células mesenquimais (MSCs) ao longo da via osteoblástica e conduz estas células a formação de novos ossos (46). Devido a essas propriedades, as biocerâmicas de fosfato de cálcio entraram no campo de medicina regenerativa e em estratégias na engenharia de tecidos (47). A Tabela 2, lista algumas propriedades necessárias para o funcionamento correto dessas biocerâmicas em aplicações médicas (1).

Tabela 2 - Propriedades requeridas aos fosfatos de cálcio para aplicações médicas(1).

Propriedade	Definição/Função
Bioatividade	A capacidade inerente de um material para participar de reações biológicas específicas ou ter um efeito sobre os tecidos vivos
Biocompatibilidade	A capacidade de um material em executar uma resposta apropriada como hospedeiro em uma aplicação específica
Fixação bioativa	As superfícies reativas formam a ligação química com o osso, minimizando assim a formação de cápsulas fibrosas
Bioestabilidade	A capacidade de um material em manter suas propriedades <i>in vivo</i>
Cristalinidade	Um maior nível de cristalinidade impede a reabsorção rápida (dissolução) das biocerâmicas nos fluidos corporais
Estabilidade interfacial e boa adesão	Evitar falhas mecânicas sob condições de suporte de carga
Osteointegração	Ancoragem direta de um implante pela formação de tecido ósseo à sua volta sem crescimento de tecido fibroso na interface osso/implante
Osteocondução	Capacidade de fornecer "molde" (<i>scaffold</i>) para a formação de novos ossos
Osteoindução	O processo pelo qual a osteogênese é induzida. Esse termo significa que as células primitivas, indiferenciadas e pluripotentes são de alguma forma estimuladas a desenvolver-se na linhagem celular formadora de ossos
Reabsorção	Degradação gradual ao longo do tempo que substitui o biomaterial pelo tecido hospedeiro natural
Capacidades terapêuticas	Sistemas controlados de liberação de fármacos e fatores de crescimento <i>in situ</i>
Molhabilidade	A propriedade que indica a capacidade de um material em atrair/repelir moléculas de água

Fonte: ELIAZ , METOKI (2017, p.14) (1).

A partir de suas estruturas químicas, os fosfatos de cálcio podem ser classificados em relação aos seus ânions fosfatos em: orto (PO_4^{3-}), meta (PO_3^-), piro ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), e poli ($\text{PO}_3)_n^{n-}$. Em biomedicina, a maioria dos fosfatos de cálcio utilizados são do tipo orto. Por definição, os ortofosfatos de cálcio são formados principalmente por três elementos principais: cálcio (no estado de oxidação +2), fósforo (no estado de oxidação +5) e oxigênio (no estado de redução -2). Além disso, a composição química de muitos ortofosfatos de cálcio podem incluir hidrogênio, como parte de um

ânion ácido ortofosfato (por exemplo, HPO_4^{2-} ou H_2PO_4^-), hidróxido (por exemplo, na HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e/ou água incorporada (por exemplo, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (44,47). O arranjo atômico dos ortofosfatos de cálcio pode ser descrito como uma rede de unidades tetraédricas de PO_4 , que dão estabilidade a toda a estrutura. A maioria deles é moderadamente solúvel em água e insolúvel em soluções alcalinas, mas todos eles são facilmente solúveis em ácidos (44). Quanto menor a relação molar Ca/P, mais ácido e solúvel em água é o ortofosfato de cálcio. Sendo assim a solubilidade varia de valores elevados para compostos ácidos, como o fosfato monocálcico monohidratado (MCPM), para valores muito baixos para compostos básicos, como a hidroxiapatita. Em biomedicina, não se faz uso dos ortofosfatos de cálcio muito ácidos e solúveis (47).

A estrutura cristalina e a química dos ortofosfatos de cálcio permitem diferentes substituições tanto em posições aniônicas como em catiônicas. Como exemplo representativo, a Figura 2 ilustra a estrutura cristalina da HA e algumas possíveis substituições iônicas. Por exemplo, os íons Ca^{2+} podem ser facilmente substituídos por cátions de Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Fe^{2+} e assim por diante. Além disso, os ânions de fosfato podem ser parcialmente substituídos por grupos carbonato (CO_3^{2-}), silicato (SiO_4^{4-}), e assim por diante. No caso da HA, os grupos OH podem ser substituídos com bastante frequência por F^- , Cl^- , CO_3^{2-} , O^{2-} , e assim por diante. Finalmente, é importante salientar que as substituições estão intimamente ligadas a muitos fosfatos de cálcio não estequiométricos. Muitas vezes, as posições da rede cristalina não estão totalmente ocupadas, deixando vacâncias nessas posições e resultando na formação de compostos não-estequiométricos, como as hidroxiapatitas deficientes de cálcio (CDHA). Nestes compostos, o desequilíbrio iônico é equilibrado com a substituição de grupos PO_4^{3-} por HPO_4^{2-} ou CO_3^{2-} , ou por geração de vacâncias adicionais na posição dos grupos hidroxila (OH^-). Esses defeitos muitas vezes levam a materiais com respostas biológicas aprimoradas, com base na maior reatividade derivada da presença de defeitos nos sólidos (47).

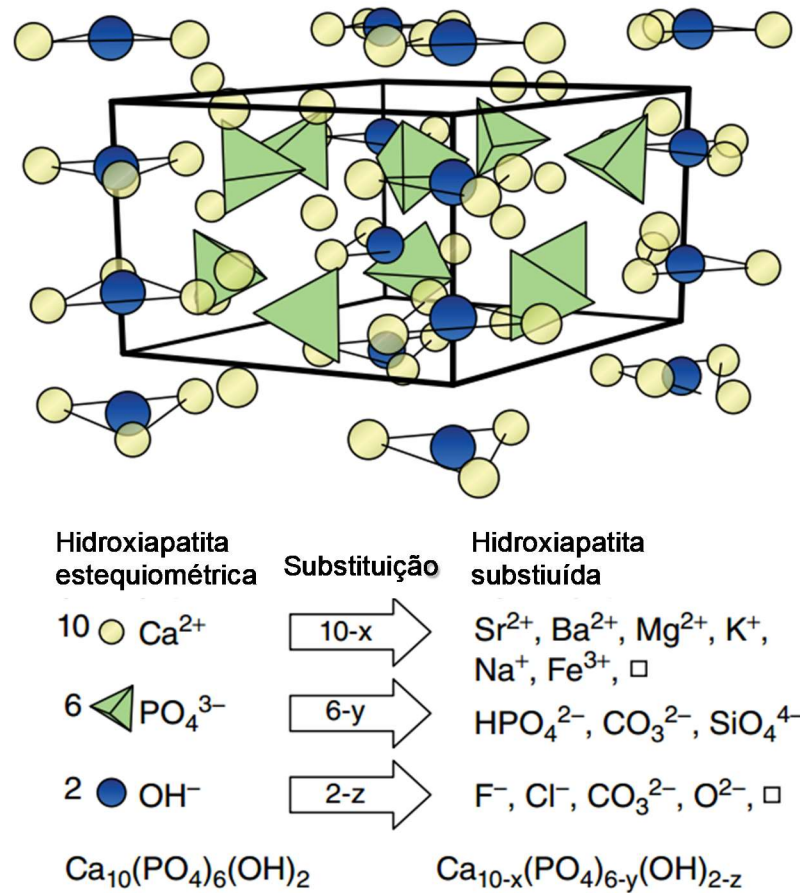


Figura 2 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita e algumas das substituições iônicas mais comuns que ocorrem na cela unitária.

Fonte: ARCOS (2014, p.27) (47)

Existem muitos fosfatos de cálcio mas apenas alguns são usados em biomedicina. A Tabela 3 lista os principais ortofosfatos de cálcio, classificados a partir de suas razões Ca/P (1).

Tabela 3 - Ortofosfatos de cálcio ordenados por sua razão Ca/P (1).

Razão molar Ca/P	Nome	Fórmula Química	Faixa de pH (estabilidade) em solução aquosa a 25°C	Densidade (g/cm ³)
0,5	Fosfato monocalcico monohidratado (MCPM)	Ca(H ₂ PO ₄).2H ₂ O	0,0-2,0	2,22
0,5	Fosfato monocalcico anidro (MCPA)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	Estável a temperaturas acima de 100°C	2,58
1,0	Fosfato dicalcico anidro (monetita, DCPA)	CaHPO ₄	2,0-5,5 (>80°C)	2,93
1,0	Fosfato de cálcio dibásico dihidratado (DCPD)	CaHPO ₄ .2H ₂ O	2,0-6,0	2,32
1,33	Fosfato octacalcico (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ .5H ₂ O	5,5-7,0	2,67
1,5	α-Fosfato tricalcico (α-TCP)	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1	2,81
1,5	β-Fosfato tricalcico (β-TCP)	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1	3,06
1,2-2,2	Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	Ca _x H _y (PO ₄) _z .nH ₂ O, n = 3–4.5, 15%–20% H ₂ O	~5-12 ²	-
1,5-1,67	Hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA)	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} (0 < x < 2) ³	6,5-9,5	-
1,67	Hidroxiapatita (HA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	9,5-12,0	3,15
2,0	Fosfato tetracalcico (TTCP)	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	1	3,06

¹Estes compostos não podem ser precipitados a partir de soluções aquosas;

²Sempre metaestável. A composição do precipitado depende da composição e do pH da solução de eletrólito; ³No caso de x = 1 (a condição de limite para Ca/P = 1,5), a fórmula química é a seguinte: Ca₉(HPO₄)(PO₄)₅(OH). **Fonte:** ELIAZ, METOKI (2017, p. 17) (1).

Os ortofosfatos de cálcio com uma relação Ca/P abaixo de 1 são muito ácidos e solúveis para serem implantados. A HA e o β-TCP estão entre os mais utilizados em biomedicina, enquanto outros fosfatos de cálcio podem ser parte de misturas

bifásicas (α -TCP) ou como componentes de cimentos ósseos como o fosfato dicálcico anidro (DCPA) ou ofosfato de tetracálcio (TTCP) (47).

2.2.1.2 Hidroxiapatita

A Hidroxiapatita (HA ou HAp, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, mas geralmente escrito como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para indicar que a cela unitária do cristal compreende duas moléculas (44)) tem a composição teórica de 39,68%(m) Ca, 18,45% (m) P e uma razão em massa de Ca/P de 2,15 (correspondente à razão atômica de Ca/P de 1,67). A HA é mais estável do que outros fosfatos de cálcio em uma faixa de pH de 4,2-8,0 e é o principal componente mineral dos ossos e dentes (48). HA constitui cerca de 70% dos minerais ósseos; outros componentes ósseos incluem íons, tais como carbonato (CO_3^{2-}), hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}), sódio (Na^+), potássio (K^+), fluoreto de magnésio (MgF^{2+}) e cloreto (Cl^-) (49). As semelhanças químicas e de composição da hidroxiapatita em relação aos componentes inorgânicos dos ossos a tornam um biomaterial adequado para o substituto ósseo e também muitas outras aplicações biomédicas (2). A HA derivada tanto de fontes naturais como de fontes sintéticas é considerada bioativa, uma vez que forma uma forte ligação química com o tecido ósseo do hospedeiro e, portanto, é reconhecida como um bom material de enxerto ósseo. A HA não é apenas bioativa, mas também osteocondutora, não tóxica e não imunogênica (1).

A HA quimicamente pura cristaliza-se sob uma forma monoclinica com grupo espacial P_{21}/b , e com parâmetros de rede $a = 9,422 \text{ \AA}$, $b = 2a$, $c = 6,881 \text{ \AA}$ e $\gamma = 120^\circ$ (50). Entretanto, a temperaturas acima de 250°C há uma transição da fase monoclinica para a hexagonal. Nesse caso, a estrutura da HA pode ser descrita como uma célula unitária hexagonal com grupo espacial P_{63}/m e os parâmetros da rede $a = 9,432 \text{ \AA}$ e $c = 6,881 \text{ \AA}$ (51,52). Nessa estrutura, os 10 íons cálcio da cela unitária podem ocupar dois sítios distintos, nomeados de I e II. Quatro no sítio I tetraédricos, e seis no sítio II octaédricos. Os íons cálcio do sítio I situam-se ao longo de colunas paralelas ao eixo c, e estão coordenados a seis átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4 , e também a três outros átomos de oxigênio relativamente distantes. Já os íons cálcio do sítio II, situam-se em triângulos

equiláteros perpendiculares ao eixo c e estão associados a dois grupos hidroxila (47,53).

Os tetraedros dos grupos PO_4 estão arranjados de tal forma que possibilitam a formação de dois tipos de canais perpendiculares ao plano basal. O primeiro canal com diâmetro de 2Å é paralelo aos eixos ternários e são ocupados por átomos de Ca(I) . Em cada cela unitária, encontram-se 2 canais ocupados por íons Ca(I) que estão localizados em $z = 0$ e $z = \frac{1}{2}$ do parâmetro de rede cristalina. O segundo canal que tem diâmetro de $3,0$ a $3,5 \text{Å}$, é constituído por íons Ca(II) e estão localizados em $z = \frac{1}{4}$ e $z = \frac{3}{4}$. No interior desses canais dá-se a distinção entre a forma hexagonal e a monoclínica. Na estrutura hexagonal o grupo hidroxila ocupa apenas 50% das posições estatisticamente possíveis. Deformações na rede causadas pelo deslocamento das hidroxilas tornam a estrutura monoclínica, um arranjo mais fechado, com grupo espacial $P_{21/b}$ (53). A estrutura atômica da hidroxiapatita projetada no eixo x,y é ilustrada na Figura 3.

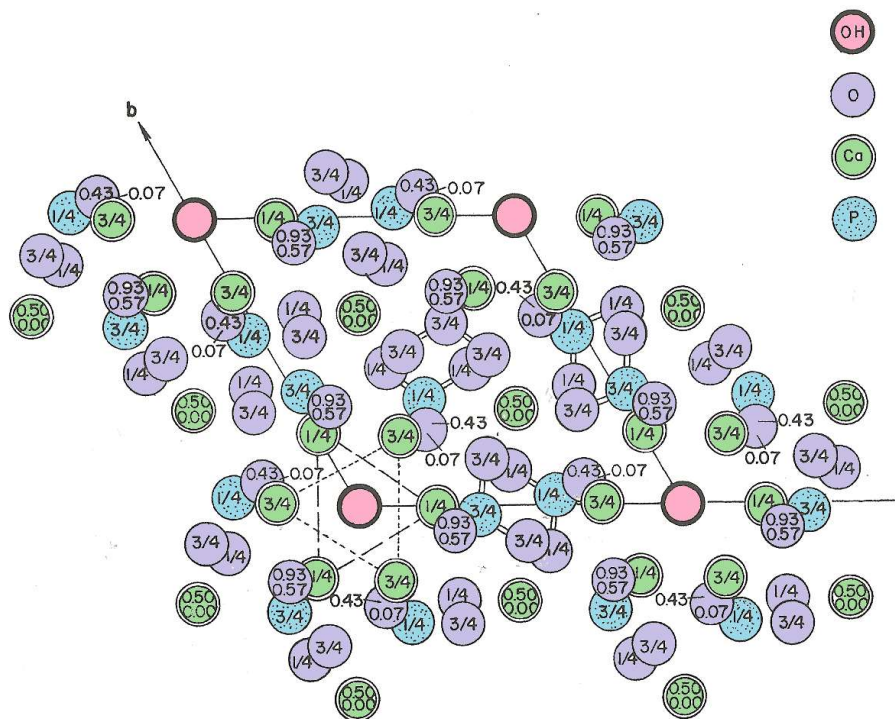


Figura 3 - Estrutura da hidroxiapatita projetada no plano x, y.
Fonte: KAY, YOUNG, POSNER (1964, p.1050) (54).

As primeiras aplicações da hidroxiapatita como biomaterial que se tem conhecimento ocorreram por volta de 1970. Em 1978, Hubbard et. al sintetizaram uma mistura de HA com β -TCP para uso como enxerto ósseo (55). Em 1980-1990, o interesse em HA como material de enxerto ósseo aumentou e suas aplicações se voltaram para a cura de fraturas, defeitos ósseos, substituição de articulações e cirurgia oral e maxilofacial (3). Ao longo dos anos, o conceito de substitutos ósseos mudou da restauração do defeito ósseo para à regeneração e funcionalidade óssea. Portanto, a aplicação de vários polímeros em diferentes materiais de fosfato de cálcio tem sido amplamente investigada para atingir esse objetivo. A hidroxiapatita também foi investigada para aplicações não-biomédicas, como material de revestimento para colunas de cromatografia (uma vez que absorve proteínas e ácido nucléicos), biocatalisador e sensor de gás e poluição (56). A HA absorve materiais que possuem proteínas como vírus, portanto, filtros revestidos de HA foram produzidos para a remoção de vírus e odores em máscaras antivirais (25). Em muitas aplicações, forma, tamanho, pureza e homogeneidade da hidroxiapatita são características muito importantes para a sua funcionalidade. Na engenharia de tecidos, a HA de tamanho nanométrico é importante, uma vez que proporciona uma biocompatibilidade adequada e integração com o osso, que tem cristais de HA em escala nano (31).

Pureza, morfologia, estequiometria e microestrutura da HA são fatores críticos que afetam sua toxicidade celular, propriedades mecânicas, osteocondutividade biocompatibilidade e bioatividade. Portanto, quando a HA é utilizada para a aplicação biomédica, as propriedades físicas e químicas do material são muito importantes. Existem vários métodos que foram desenvolvidos ao longo dos anos para sintetizar hidroxiapatita, tais como método de via úmida, método via seca, método hidrotermal e métodos combinados. No entanto, os métodos de síntese da HA podem ser categorizados como reações de estado sólido e reações de via úmida (2).

Diversos métodos de síntese utilizam reações de via úmida incluindo, método hidrotermal (57,58), precipitação (59,60), síntese sol-gel (61–63), emulsão e macroemulsão (64–66). Entre eles, os mais comuns são os métodos hidrotérmicos, de precipitação e sol-gel. Em comparação aos métodos via seca, os métodos de via úmida oferecem um melhor controle sobre o crescimento e morfologia dos cristais de

hidroxiapatita (53). Além disso, são geralmente simples e fáceis; no entanto a principal desvantagem pode ser a incorporação de diferentes íons, provenientes da água, no produto final da síntese, levando a formação de fases impuras diferentes da HA. O uso de diferentes aditivos, precursores e modificadores pode ser usado para produzir cristais com diversas formas, tamanhos e funcionalidades (2).

O método sol-gel tem sido utilizado há mais de um século para a produção de cerâmicas. Entre suas vantagens está a eliminação da necessidade de se utilizar valores elevados de pH ou alta temperaturas, além de produzir produtos de alta pureza e homogêneos (23). Nesse processo, os precursores são misturados em nível molecular, o que melhora a homogeneidade do produto final. É possível obter partículas nano-cristalinas com diferentes formas apenas mudando a química ou as condições do processo (23). No entanto, o alto custo da produção é um inconveniente deste método (67). A Tabela 4 descreve as vantagens e desvantagens do método de estado sólido em comparação aos principais métodos de via úmida.

Tabela 4 - Vantagem e desvantagem de diferentes métodos de produção de HA (2).

Método	Vantagens	Desvantagens
Estádo sólido	-Produção em massa; -Pó de HA com estrutura estequiométrica, grande área de superfície e pequenos tamanhos de clusters.	-Heterogeneidade em sua composição de fase, devido aos pequenos coeficientes de difusão dos íons dentro da fase sólida; -Tempo e temperatura de sinterização elevados.
Precipitação	-Simples; -Baixa temperatura de síntese; -Partículas de Nano HA; -Possibilidade de produção em grande escala.	-HA pobremente cristalizada, sem qualquer forma regular e sem relação estequiométrica; -Alto pH; -Alta temperatura de sinterização; -Sensível ao pH, taxa de agitação e temperatura de secagem.
Sol-gel	-Mistura de reagentes a nível molecular, melhorando a homogeneidade química do pó resultante; -Baixa temperatura e pressão de síntese; -Fácil de executar; -HA com razão estequiométrica; -Partículas de Nano HA; -Pureza de fase.	-Geração de fase secundária; -Alto custo de alguns dos reagentes de partida, especialmente precursores à base de alcóxido, -Difícil de hidrolisar o fosfato.
Hidrotermal	-HA relativamente estequiométrica e altamente cristalina; -Terceiro método mais popular após os métodos convencionais de precipitação e combinação; -Capacidade de induzir crescimento 1D; -Pó homogêneo; -Partícula de nano HA.	-Temperatura e pressão elevadas de síntese; -Precisam de equipamentos caros; -Aglomeração do produto.

Fonte: SHAVANDI, BEKHIT, SUN, ALI (2015, p. 109) (2).

2.2.1.3 Fosfatos de cálcio porosos

Os fosfatos de cálcio vêm sendo extensivamente utilizados clinicamente como substitutos ósseos, em odontologia e em engenharia de tecidos ósseos, mas nos anos recentes foi adicionada uma nova dimensão a essas aplicações, o uso desses materiais como liberadores controlados de fármacos (17).

Em sistemas de liberação controlada de fármacos, se reconhece que uma liberação lenta, local e contínua de medicamentos seria uma vantagem decisiva para o tratamento de muitas doenças. Um dos candidatos potenciais para os sistemas de liberação controlada de fármacos são os fosfatos de cálcio (HA e β -TCP) porosos. Os fosfatos de cálcio porosos exibem forte ligação ao osso, pois os poros

proporcionam uma interligação mecânica que conduz a uma maior fixação do material, permitindo boa adesão celular. O tecido do osso cresce no interior dos poros, aumentando a integração do implante (18). Além de uma melhor fixação do material nos ossos, os poros têm a capacidade de incorporar um fármaco fisicamente ou quimicamente, reter o fármaco até o local do alvo específico, e ser gradualmente disponibilizados, liberando um agente terapêutico *in situ* de um modo controlado ao longo do tempo (17). Como exemplo de agentes terapêuticos usados para tratamentos de doenças e desordens ósseas, tem-se (68):

- Os fatores de crescimento- aprimoram a diferenciação osteogênica, acelerando o processo de cura. Exemplo: proteínas morfogenéticas ósseas (BMP)

- Antibióticos - previnem infecções ósseas. Exemplo: Gentamicina

- Fármacos antiosteoporóticos - normalmente inibem a reabsorção dos osteoclastos (células responsáveis por degradarem os ossos). Exemplo: Bisfosfonatos.

- Fármacos quimioterapêuticos - tratamento de osteossarcomas. Exemplos: Cisplatina e metotrexato.

O fluxo de uma substância, através de uma camada porosa está conectado a dois parâmetros principais: sua solubilidade nos fluidos corporais e as possíveis ligações físicas ou químicas formadas por suas moléculas com as paredes dos poros do dispositivo de liberação (69). Os sistemas de liberação de fármacos em exertos ósseos, também foram desenvolvidos usando cerâmicas porosas de fosfato de cálcio ligadas com fármacos através de matrizes poliméricas biodegradáveis (18). A utilização de polímeros biodegradáveis tem como objetivo a obtenção de um dispositivo de liberação controlada. Muitos tipos de polímeros biodegradáveis são utilizados para este fim, incluindo gelatina, albumina e poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (18,70).

Existem diversos métodos de preparação de hidroxiapatitas porosas, dentre os quais pode-se citar o método da esponja polimérica (71,72) e a técnica de formação de espuma cerâmica (73,74). Dentro desses métodos destaca-se o uso de técnicas como as de molde de sacrifício. As biocerâmicas são preparadas em cima desses materiais que servem como molde e depois estes materiais são retirados para a obtenção dos poros. Diversos materiais podem ser utilizados para moldes de sacrifício como poliestireno, quitosana com ácido poliacrílico e esferas de sílica. A

Figura 4 ilustra um esquema de preparação de hidroxiapatita porosa utilizando um molde de sacrifício de esferas de sílica. O grande interesse nesse material é a facilidade de síntese e a possibilidade de se obter esferas numa extensa faixa de tamanhos, tanto nanométricos como micrométricos (75), possibilitando a obtenção de materiais com poros de diferentes tamanhos.

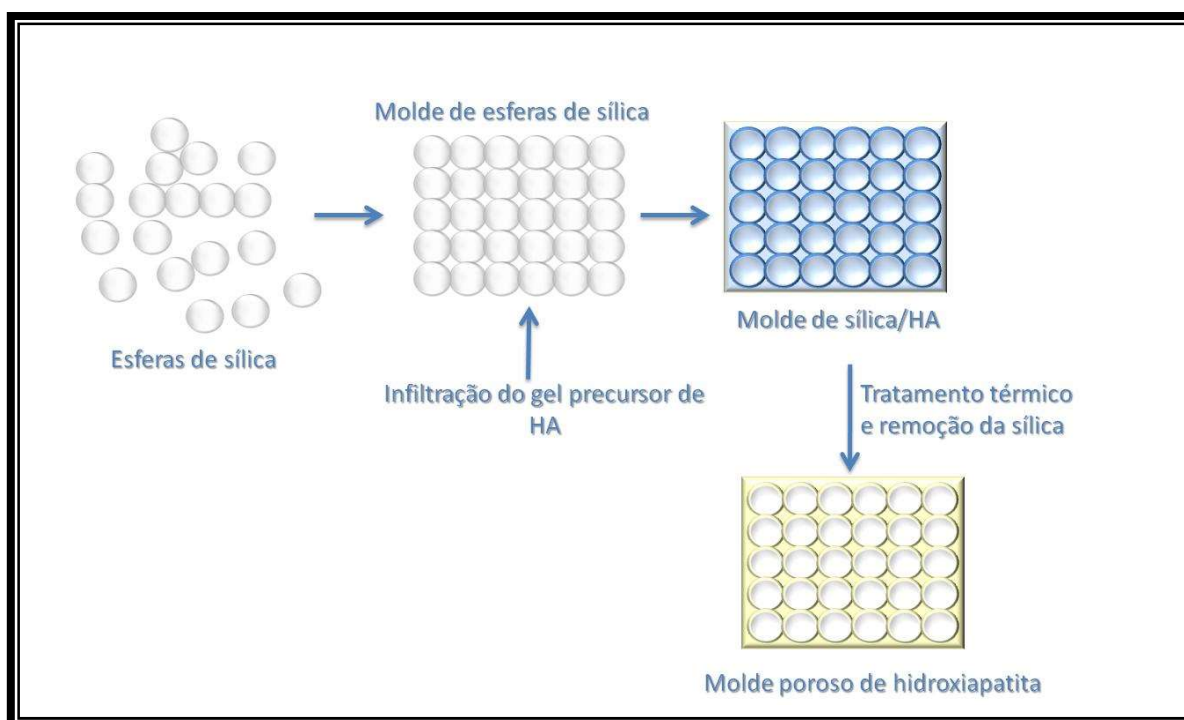


Figura 4 - Esquema de preparação da hidroxiapatita porosa utilizando um molde empacotado de esferas de sílica.

Fonte: Autor.

2.3 Modificação com polímero - Pluronic®

Polímeros biodegradáveis são frequentemente utilizados com os fosfatos de cálcio para criar biocompósitos cerâmica-polímero e melhorar as propriedades mecânicas das cerâmicas. O recobrimento de moldes porosos (*scaffolds*) de hidroxiapatita com polímeros é frequentemente aplicado para melhorar a fragilidade e a força mecânica desses biomateriais (17). Em sistemas de liberação de fármacos, o revestimento polimérico pode ser usado como reservatório de medicamentos e para controlar o comportamento da liberação. Escolhendo o polímero correto é possível encapsular tanto fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos, e fazer uso de suas propriedades específicas para controlar a liberação, como por exemplo,

temperatura para polímero termossensíveis ou pH para pH sensíveis. Os polímeros mais utilizados para aplicações em medicina incluem polietilenoglicol (PEG), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido glutâmico) (PGA), policaprolactona (PCL), copolímeros de N-(2-hidroxipropil) metacrilato (HPMA) e poliaminoácidos (76–78).

Visando a possibilidade de incorporar tanto fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos existe uma classe de copolímeros anfifílicos triblocos (tipo ABA) sob o nome comercial de *Pluronic*[®] (ou Poloxameros, nome não comercial). Eles são surfactantes não iônicos, formados por unidades de óxido de polietileno PEO (unidade hidrofílica - A) e óxido de polipropileno PPO (unidade hidrofóbica - B) (19,78), a Figura 5 ilustra a estrutura molecular genérica dos *Pluronic*[®].

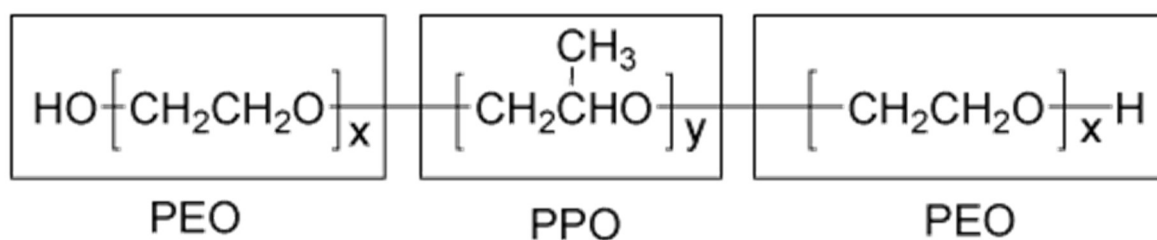


Figura 5 - Estrutura molecular genérica dos *Pluronic*[®].

Fonte: Autor.

Eles podem ser encontrados em diferentes razões entre seus monômeros PO/EO, levando a diferentes massas molares e principalmente diferentes balanços lipofílicos-hidrofílicos (HLB) (19), oferecendo um leque de mais de 50 opções de copolímeros. A Tabela 5 lista alguns *Pluronic*[®] e suas principais propriedades (19). Os *Pluronic*[®] possuem uma nomenclatura específica introduzida pela BASF, seu fabricante original. Consistindo em uma letra que indica o estado físico do copolímero, sendo L (para líquido), P (para pastoso) e F (para flocos), e depois o primeiro ou os dois primeiros números indicam a fração do peso molecular do PPO e o último número a fração do peso molecular do PEO. Por exemplo, F128 significa que o copolímero está na forma de flocos e que possui 12% em peso molecular de PPO e 88% de PEO, já para o L64 temos um copolímero na forma líquida com 60% de PPO e 40% de PEO (79).

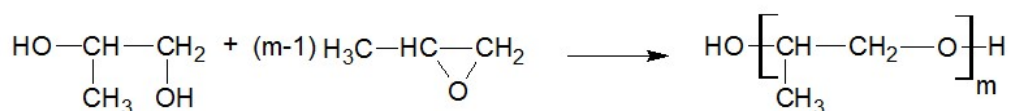
Tabela 5 - Pluronic® e suas propriedades (79).

Pluronic®	Massa Molar	Razão em massa de PPO (%)	Razão em massa de PEO (%)	HLB	Ponto de fusão (°C)
L64	2900	26,4	30	12-18	16
F68	8400	152,7	29	>24	52
F108	14600	265,5	50,3	>24	57
P105	6500	73,9	56	12-18	35
L121	4400	10	63,8	1-7	20
P123	5750	39,2	69,4	7-12	31
F127	12600	200,5	65,2	18-13	56

Fonte: ALEXANDRIDIS; HATTON (1994, p.4) (79).

Os copolímeros triblocos de PEO-PPO-PEO são sintetizados pela adição sequencial de óxido de propileno (PO) e de óxido de etileno (EO) a um propileno glicol de baixo peso molecular solúvel em água. Os passos de oxialquilação são realizados na presença de um catalisador alcalino, geralmente hidróxido de sódio ou potássio. O catalisador é então neutralizado e removido do produto final (80). As equações que representam as duas etapas na síntese dos copolímeros PEO-PPO-PEO são ilustradas na Figura 6.

Adição de PO para formar o bloco intermediário PPO



Adição de EO para formar o bloco lateral PEO

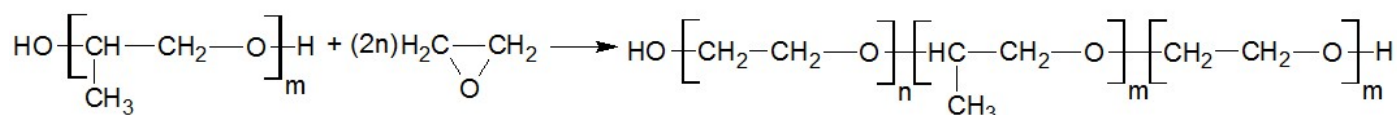


Figura 6 - Equações que representam a síntese dos copolímeros PEO-PPO-PEO.

Fonte: ALEXANDRIDIS; HATTON (1994, p.2) (79).

Em aplicações biológicas os *Pluronic*[®] se destacam por serem termossensíveis, apresentarem boa compatibilidade celular e não causarem irritação após aplicação tópica ou parenteral. O tempo de circulação no sangue e o controle da liberação do fármaco podem ser controlados escolhendo o copolímero com arquitetura adequada (20,81,82). Os *Pluronic*[®] também têm sido usados para preparar dispersões sólidas, esse método é utilizado para aumentar a solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis (83).

2.4 Bisfosfonatos - Alendronato

O alendronato é um fármaco antioesteoporótico amplamente utilizado em distúrbios ósseos, incluindo a osteoporose e doença de Paget (21). Ele faz parte de um grupo de fármacos sintéticos chamados bisfosfonatos (BP), com estrutura similar aos pirofosfatos inorgânicos (Figura 7). Atualmente é a classe mais importante e efetiva de fármacos para distúrbios ósseos, porque, sendo inibidores potentes da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, os bisfosfonatos demonstraram aumentar a densidade óssea, diminuir os marcadores da remodelação óssea, e reduzir os riscos de fraturas osteoporóticas (84,85).

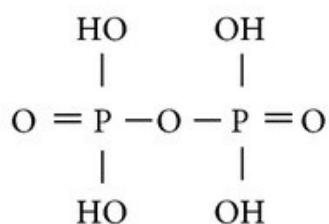


Figura 7 - Estrutura do pirofosfato.
Fonte: Autor

A diferença estrutural entre os pirofosfatos e os bisfosfonatos é a substituição do oxigênio que conecta os dois fosfatos por um átomo de carbono. Devido a sua estrutura química, os bisfosfonatos têm alta afinidade com a hidroxiapatita (86), os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos dos BPs quelam os íons cálcio da hidroxiapatita (87). Como a hidroxiapatita está presente nos ossos e dentes, ela representa um alvo ideal para tratar doenças associadas a esses tecidos (21).

Embora os bisfosfonatos tenham sido utilizados há mais de 100 anos, apenas recentemente que eles foram estabelecidos como medicamentos de primeira linha para doenças ósseas (88). Os bisfosfonatos foram ,provavelmente, descobertos em 1894 pelo farmacêutico Theodor Salzer, mas foram utilizados apenas nas indústrias têxtil e de óleo como inibidores de corrosão e agentes complexantes (89). Então, na década de 1960, Fleisch et al. (90,91) descobriram que o pirofosfato inorgânico, que é um subproduto em vários processos fisiológicos (por exemplo, a síntese de aminoacil-tRNA) (92), poderia prevenir a calcificação dos ossos por ligação a hidroxiapatita e inibindo a sua dissolução. Os autores reconheceram então o potencial desta descoberta em doenças ósseas. Entretanto, enquanto os pirofosfatos não conseguiram influenciar a reabsorção óssea devido à hidrólise rápida, descobriu-se mais tarde que os bisfosfonatos, que são análogos não hidrolisáveis do pirofosfato, inibiram a reabsorção óssea (93) e também apresentaram eficácia in vivo (94,95). Ao mesmo tempo, Francis et al. (96,97) na *Procter & Gamble* também estavam investigando as propriedades dos bisfosfonatos, e em colaboração com Fleisch, trataram uma criança que sofria de miosite ossificante progressiva com o bisfosfonato etidronato (97). Depois de alguns meses de administração do etidronato, a maioria dos inchaços de tecido mole recém formados regrediram dentro de alguns dias sem qualquer evidência de calcificação subsequente. Além disso, o progresso da doença aparentemente foi abrandado ou até mesmo interrompido (97).

Quimicamente, os bisfosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato, um regulador endógeno de mineralização óssea, que contém uma estrutura principal P-C-P não hidrolisável com duas cadeias laterais (R1 e R2) (98). Os dois grupos fosfonatos são necessários para a ligação ao mineral ósseo, e para o potencial anti-reabsorção dos BP (99). A afinidade dos bisfosfonatos com o mineral ósseo pode ser aumentada, se R1 for um grupo hidroxila (OH), quase todos os bisfosfonatos no uso clínico atual possuem um grupo hidroxila R1 (87). Coletivamente, os grupos fosfato e hidroxila criam uma interação terciária e não binária entre o bisfosfonato e a matriz óssea, conferindo aos bisfosfonatos uma boa especificidade com os ossos (100). Embora os grupos fosfato e a hidroxila sejam essenciais para a afinidade do bisfosfonato a matriz óssea, a cadeia lateral R2 ligada ao carbono central é o principal fator na atividade do bisfosfonato para a inibição da reabsorção óssea (84).

A presença de um grupo nitrogênio ou amina aumenta a capacidade anti-reabsorção do bisfosfonato de 10 para 10.000 em relação aos bifosfonatos que não contem nitrogênio, como o etidronato (Tabela 6) (100).

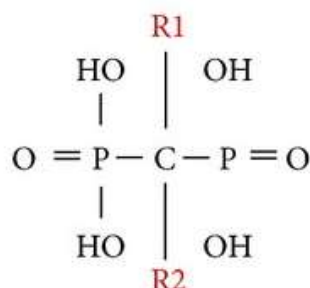


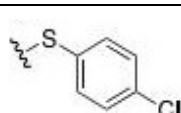
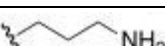

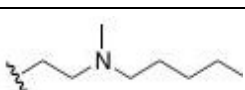
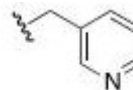
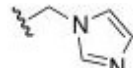


Figura 8 - Estrutura genérica dos bisfosfonatos.
Fonte: Autor

Tabela 6 - Diferentes bisfosfonatos e suas potências relativas a reabsorção óssea (21).

Bisfosfonato	R1	R2	Potencia relativa
Etidronato	-OH		1
Clodronato	-Cl		10
Tiludronato	-H		10
Alendronato	-OH		500
Pamidronato	-OH		100
Ibandronato	-OH		1000
Risendronato	-OH		2000
Zolendronato	-OH		10000

Fonte: GIGER; CASTAGNER; LEROUX (2013, p.177)(21).

O efeito farmacológico dos BP está relacionado tanto com sua habilidade de ligar aos minerais ósseos, quanto com seu efeito bioquímico nas células, inibindo a ação dos osteoclastos consequentemente a calcificação e reabsorção óssea (21,87,94). Os bisfosfonatos se ligam preferencialmente à superfície do osso em locais de remodelação ativa, e se internalizam nos osteoclastos via endocitose (101)

(Figura 9-A). Dois mecanismos distintos de ação podem ocorrer dependendo do tipo de bisfosfonato. Os bisfosfonatos que não contêm nitrogênio (etidronato, clodronato e tiludronato) são considerados bisfosfonatos de primeira geração. Eles inibem a reabsorção óssea gerando análogos citotóxicos de ATP que interferem na função mitocondrial e induzem a apoptose dos osteoclastos (102). No entanto, os bisfosfonatos que contêm nitrogênio (pamidronato ou alendronato) são mais potentes do que os bisfosfonatos da primeira geração, e inibem a reabsorção óssea através da via do mevalonato (103–105). A Figura 9-B ilustra o mecanismo de inibição via mevalonato (106).

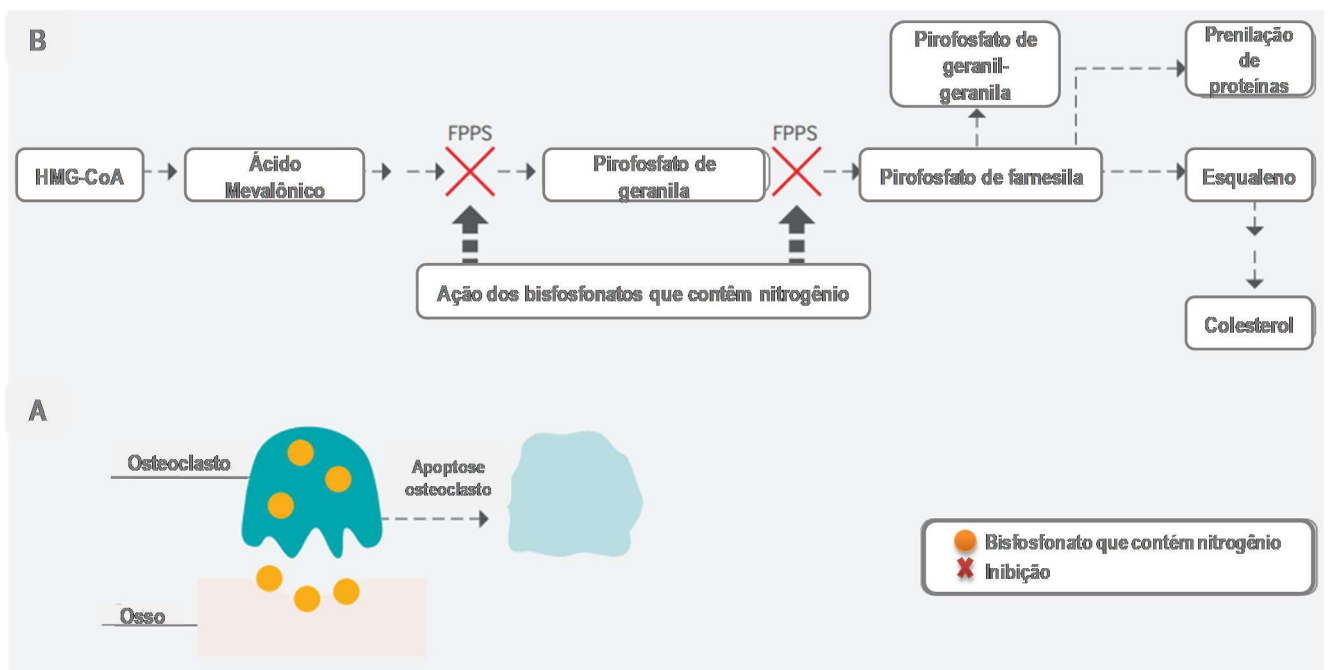


Figura 9 - (a) Endocitose do bisfosfonato pelos osteoclastos a partir da superfície óssea, (b) Mecanismo de ação dos bisfosfonatos contendo nitrogênio, estes inibem seletivamente a farnesil pirofosfato sintase de (FPPS) nos osteoclastos, o que interrompe a via do mevalonato.

Fonte: MARAKA, KUNNEL (2015, p. 2) (106).

Normalmente os bisfosfonatos como o alendronato são administrados por injeção intravenosa ou por via oral, o que pode causar efeitos colaterais tais como febre, úlceras na garganta e úlceras no estômago além de sua biodisponibilidade ser muito baixa (17). Liberando o alendronato *in situ*, este irá induzir uma osteogênese precoce, reduzindo o risco de fratura óssea devido à osteoporose e melhorando a interligação mecânica do implante com o tecido ósseo hospedeiro, além de levar a uma recuperação cirúrgica mais rápida (17).

Objetivos

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é a preparação de um biocompósito poroso de hidroxiapatita (*scaffold*), modificar sua superfície com uma matriz polimérica de PEO-PPO na qual o fármaco alendronato estará incorporado visando a liberação controlada de fármaco, para o uso como substituto ósseo para pessoas com osteoporose. A aplicação do material seria para a regeneração de fraturas causadas devido a osteoporose.

Capítulo I

Síntese e caracterização dos biocompósitos de hidroxiapatita porosa modificados com Pluronic[®] para a liberação de alendronato.

1. INTRODUÇÃO - OBJETIVOS

Visando um melhor entendimento, este trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo abordara a síntese e caracterização dos biocompósitos preparados. Sendo três tipos de biocompósitos diferentes, polímero-alendronato, hidroxiapatita porosa-alendronato e hidroxiapatita porosa-polímero-alendronato. Todos os biomateriais foram caracterizados por difratometria de raios X, espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, calorimetria exploratória diferencial além de realizadas suas curvas de liberação de alendronato.

Os objetivos específicos desse capítulo são:

- Preparar as matrizes de PEO-PPO com o fármaco alendronato incorporado, utilizando o método da dispersão sólida;
- Sintetizar esferas de sílica utilizando o método de Stöber (75) e preparar o molde empacotado;
- Sintetizar o precursor de HA utilizando o método sol-gel;
- Preparar os fosfatos de cálcio porosos infiltrando o precursor de HA no molde de esferas de sílica e depois removendo-as;
- Preparar o biocompósito hidroxiapatita porosa (preparada anteriormente) com incorporação do alendronato utilizando uma incubação de 24h;
- Preparar o biocompósito hidroxiapatita porosa com incorporação do alendronato usando a matriz de PEO-PPO (método da dispersão sólida);
- Observar as diferenças no perfil de liberação dos biocompósito *Pluronic*[®]-alendronato, HA-alendronato e HA-*Pluronic*[®]-alendronato.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Liberação controlada de fármacos

O campo de liberação controlada começou no início da década de 1950 com o desenvolvimento de sistemas poliméricos que foram capazes de liberar medicamentos orais de forma customizada (107). Logo após, a liberação controlada de anti-incrustantes marinhos foi alcançada na década de 1950 (107,108), seguida da de fertilizantes na década de 1970 (109). A liberação dos fármacos carregados pode ser variada por muitos fatores diferentes, incluindo o ambiente de liberação, a difusão, o peso molecular e a solubilidade do fármaco, tamanho de poro e degradação dos carreadores poliméricos (107–109).

Os sistemas de liberação convencional (por exemplo, comprimidos, cápsulas, etc.) liberam os princípios farmacêuticos muito rapidamente uma vez administrados no corpo, o que resulta em um aumento abrupto na concentração de fármaco na corrente sanguínea, e a redução rápida dentro de um curto período de tempo. Pode ser necessária, uma dosagem repetida para manter a concentração de fármaco na faixa efetiva. Essa flutuação do nível de fármaco no plasma, pode ser tóxica e/ou resultar em fraca eficácia de fármaco, como ilustrado na Figura 10. A administração frequente da dosagem convencional também pode causar descontentamento aos pacientes (107). Em contrapartida, os sistemas de liberação controlada são projetados para melhorar a cinética de liberação do fármaco e, portanto, a eficácia da terapia medicamentosa; O nível de fármaco na corrente sanguínea aumenta e, em seguida, permanece constante no alcance efetivo, entre níveis mínimos efetivos e máximos desejados, de forma sustentada (110) (Figura 10). Em comparação com os sistemas de liberação convencional, esses sistemas oferecem muitas vantagens, incluindo a eficácia máxima de medicamentos, efeitos colaterais mínimos e redução da acumulação de medicamentos com dosagem crônica e flutuação do nível de fármaco (107).

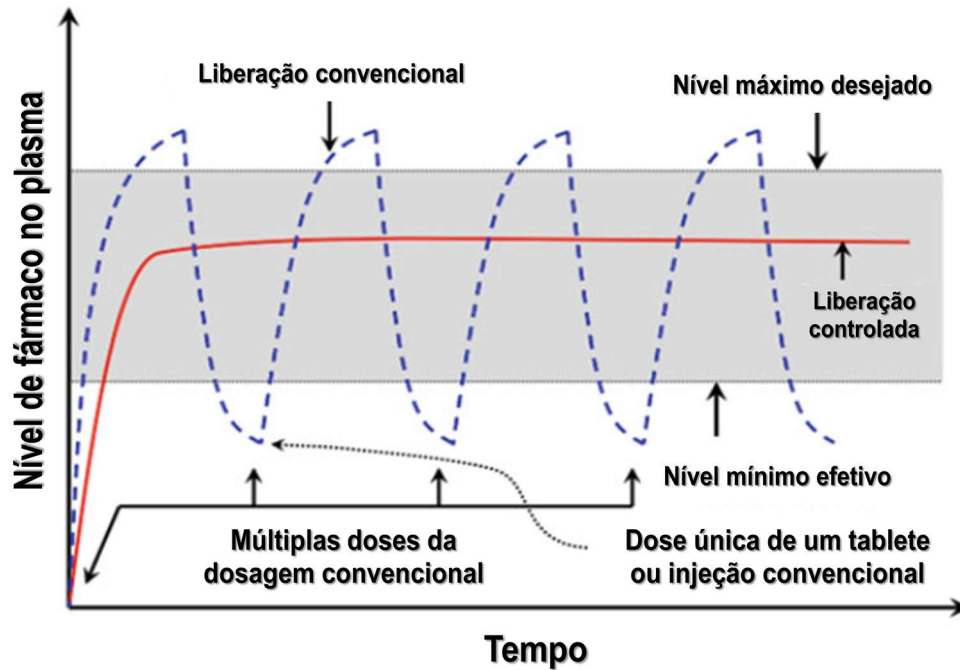


Figura 10 - Níveis de fármaco no plasma liberado pelo sistema de liberação tradicional, uma combinação de múltiplas cápsulas orais ou dose de injeção (curva tracejada azul) e sistema de liberação controlada (curva contínua vermelha).

Fonte: HUYNH; LEE (2015, p.2) (107).

Quando falamos de sistemas poliméricos de liberação controlada, vários tipos podem ser destacados:

-Sistemas de liberação controlada por difusão

A difusão, a migração de uma substância de uma região de maior concentração para uma região de menor concentração, é um fator muito importante nos sistemas de liberação controlada. Nos sistemas de liberação controlada por difusão, os fármacos são presos e liberados via difusão através de membranas poliméricas inertes e insolúveis em água (sistemas reservatórios) ou matrizes poliméricas (sistemas monolíticos) (111). Dependendo da estrutura dos sistemas e dos métodos de encapsulamento do fármaco, os sistemas de liberação controlada por difusão podem ser divididos em quatro tipos principais: (1) reservatório de fonte de fármaco não constante, (2) reservatório de fonte de fármaco constante, (3) solução monolítica e (4) dispersão monolítica (Figura 11) (112,113).

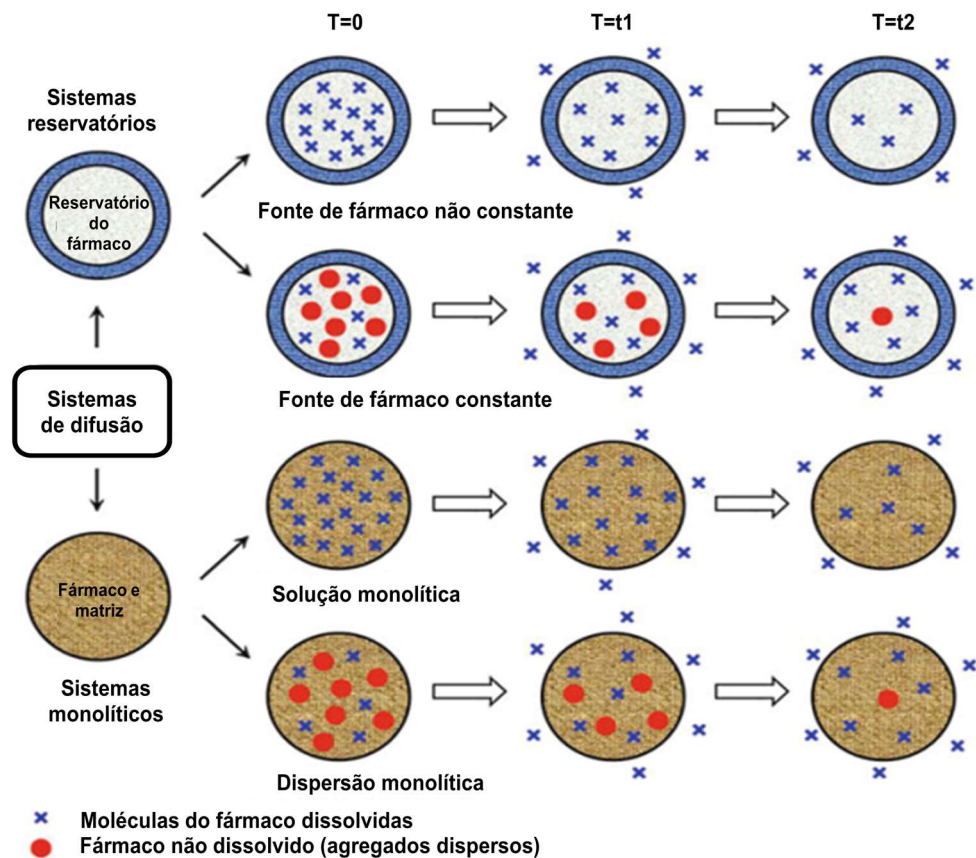


Figura 11 - Classificação de sistemas de liberação controlada por difusão de acordo com sua estrutura física e método de encapsulamento dos fármacos.

Fonte: HUYNH, LEE (2015, p. 3) (107)

-Sistemas de liberação controlada por dissolução

Nos sistemas de liberação controlada por dissolução, os fármacos são revestidos ou encapsulados dentro de membranas poliméricas que se dissolvem lentamente (sistemas de reservatórios) ou matrizes (sistemas monolíticos), respectivamente. Nos sistemas de reservatórios, os fármacos são protegidos dentro de uma membrana polimérica com baixa solubilidade. A liberação do fármaco ocorre após a dissolução da membrana polimérica. Nos sistemas monolíticos, os agregados do fármaco são distribuídos por toda a matriz polimérica. A dissolução dos agregados e a liberação do fármaco dissolvido ocorre quando a matriz se dissolve (Figura 12). Nos sistemas de liberação controlada por dissolução, a solubilidade dos carreadores poliméricos é um fator chave no controle da liberação do fármaco (107).

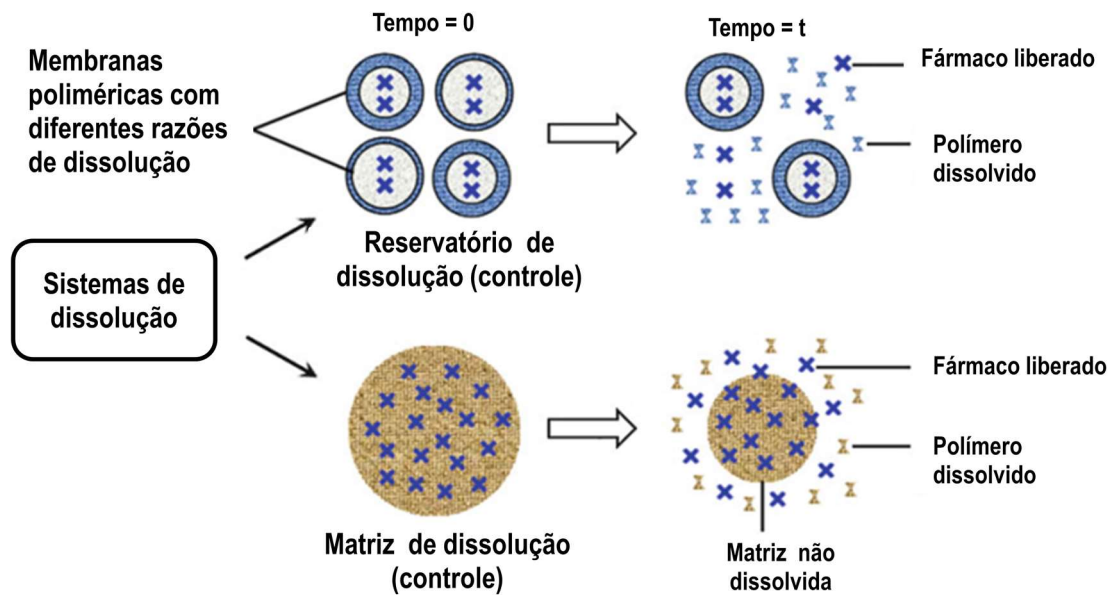


Figura 12 - Esquema dos sistemas de liberação controlada por dissolução.
Fonte: HUYNH, LEE (2015, p. 4) (107)

-Sistemas de liberação controlada quimicamente (Erosão e conjugado polímero-fármaco)

Nos sistemas de liberação controlados quimicamente, a liberação do fármaco pode ser adaptada alterando a estrutura química do polímero (como degradação, transferência de grupo, etc.) (114–116). Esse sistema pode ser dividido em dois tipos: sistemas controlados pela erosão e sistemas controlados pela conjugação polímero-fármaco. Nos sistemas controlados pela erosão, os fármacos são encapsulados em matrizes poliméricas erodíveis por dispersão e/ou interações moleculares (hidrofóbicas, iônicas, etc.) e podem ser liberados após a degradação das matrizes e dissolução e difusão das moléculas de fármaco (Figura 13). Nesses sistemas, a difusão e dissolução dos fármacos, e a erosão de matrizes poliméricas podem controlar os perfis de liberação (107).

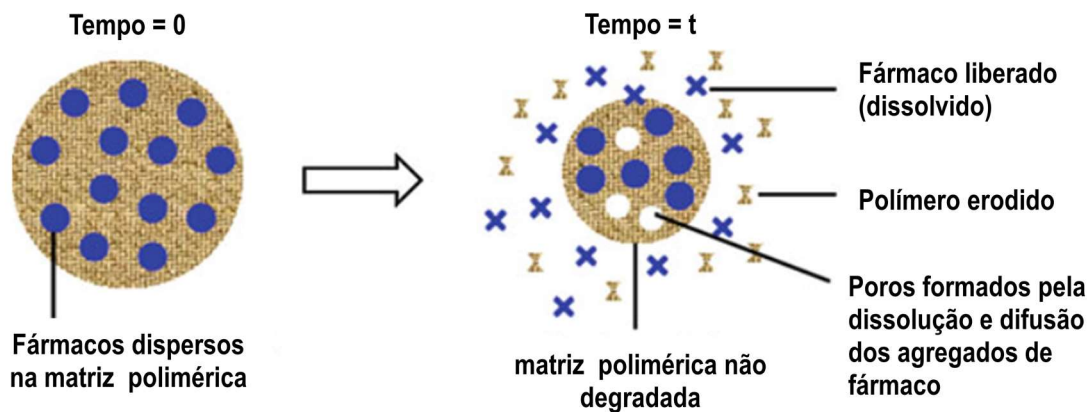


Figura 13 - Esquema de um sistema de liberação controlada por erosão.
Fonte: HUYNH, LEE (2015, p. 6) (107)

-Sistemas de liberação controlada por penetração de água

Nos sistemas de liberação controlada por penetração de água, a liberação do fármaco pode ser conseguida através da penetração de água ou fluidos corporais nos sistemas. Estes sistemas podem ser divididos em dois tipos, incluindo sistemas controlados por intumescimento e sistemas controlados osmoticamente. Em sistemas controlados por intumescimento, os agregados de fármacos são dispersos de forma homogênea em uma rede polimérica 3D. Quando esses sistemas estão imersos em água ou fluido corporal, o fluxo de água na rede polimérica 3D irá hidratar o sistema. Portanto, a quantidade de solvente aquoso dentro do sistema e o tamanho da malha da rede polimérica aumentam, resultando na dissolução e difusão do fármaco através da rede polimérica hidratada. A propriedade de intumescimento dos sistemas e as propriedades de dissolução e difusão dos fármacos são fatores-chave para controlar a liberação (110).

Nos sistemas controlados osmoticamente, a pressão osmótica causada pela presença de um agente osmótico (por exemplo, PEG, PVA) dentro de um reservatório de membrana semipermeável, que é permeável à água, mas não aos solutos (fármacos encapsulados), regula a liberação de fármaco (110).

2.1.1 Modelos de cinética de liberação

Têm sido desenvolvidos muitos modelos matemáticos com o objetivo de descrever a cinética de liberação de fármacos. No entanto, os mais frequentemente usados são os de Higuchi (117) e Peppas (118).

O modelo de Higuchi normalmente é usado para descrever matrizes em que a liberação é governada pelo processo de difusão. Ele é um modelo aproximado e fundamentado na lei de Fick. Neste, a liberação do fármaco ocorre em camadas. Após a camada da superfície ser toda liberada, inicia-se a difusão da camada seguinte (119). A equação de Higuchi (1) é dada:

$$Q_t = [2DS\varepsilon(A - 0,5S\varepsilon)]^{0,5} \times t^{0,5} = k_H\sqrt{t} \quad (1)$$

Onde: Q_t é a quantidade da substância liberada no tempo t , D é o coeficiente de difusão, S é a solubilidade do fármaco no meio de difusão, ε é a porosidade, A é o conteúdo do fármaco por centímetro cúbico da matriz e K_H é a constante de liberação para o modelo de Higuchi (119). Assim, se a cinética de liberação segue o modelo de Higuchi, uma reta é esperada ao plotar o gráfico de Q_t versus $t^{1/2}$ (120).

Korsmeyer et. al. (121) desenvolveram um modelo simples e semi-empírico que relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo (Equação 2):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2)$$

Onde M_t e M_∞ denotam a massa cumulativa de fármaco liberada no tempo t e em tempo infinito, respectivamente, k é a constante de proporcionalidade e n é o índice de liberação, indicativo do mecanismo de liberação de fármaco (119). Peppas(118) usa o valor de n para caracterizar os diferentes mecanismos de liberação. Se $n = 0,5$ indica que o mecanismo principal da liberação é a difusão do tipo Fickiana. No entanto, se $n = 1$, a equação corresponde a uma cinética de liberação de ordem zero (difusão não Fickiana denominada transporte caso II). Quando os valores de n estão entre 0,5 e 1 a difusão é uma combinação do tipo Fickiana e transporte caso II, chamado de transporte anômalo. Para valores superiores a 1 teremos um processo de difusão não fickiano chamado transporte super-caso II (122). Para formas cilíndricas e esféricas os valores de n mudam para $0,45 < n < 0,89$ e $0,43 < n < 0,85$, respectivamente. Na determinação deste

parâmetro é usada somente a porção da curva onde a razão M_t/M_∞ tem valores menores que 0,6, onde se cumpre a lei de Fick e esta equação é válida (122–124).

O modelo de Korsmeyer-Peppas é genericamente utilizado para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando possam estar envolvidos mais do que um tipo de mecanismos de liberação (118,125).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e materiais

Os solventes empregados neste trabalho foram: etanol (Panreac, absoluto, grau PA), metanol (Sigma-Aldrich) e água ultra pura.

Os reagentes utilizados foram todos listados na Tabela 7.

Tabela 7- Reagentes utilizados nos experimentos.

Reagentes	Fórmula molecular	Procedência
Tetraetilortosilicato (TEOS)	$\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$	Aldrich, 99%
Hidróxido de amônio	NH_4OH	Alfa AESAR, 28-30%
Nitrato de cálcio tetrahidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Alfa AESAR, 99-103%
Trimetilfosfato	$(\text{CH}_3)_3\text{PO}_4$	Aldrich, 99%
Hidróxido de sódio	NaOH	Synth, PA
<i>Pluronic</i> [®] F-68	$(\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$	Aldrich, MM 8.400
<i>Pluronic</i> [®] F-108	$(\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$	Aldrich, MM 14.600
<i>Pluronic</i> [®] F-127	$(\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$	Aldrich, MM 12.600
Alendronato de sódio trihidratado (AL)	$\text{C}_4\text{H}_{18}\text{NNaO}_{10}\text{P}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Galena
Ninidrina	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$	
Bicarbonato de sódio	NaHCO_3	Mallinkrodt, PA

Fonte: Autor.

3.2 Preparação da matriz polimérica com incorporação de alendronato

Para a preparação da matriz polimérica com alendronato foi utilizado o método de dispersão sólida (83). Normalmente esta técnica é utilizada para aumentar a solubilidade, taxa de dissolução e bioavaliabilidade de fármacos pouco solúveis. Neste trabalho, esta técnica foi utilizada como uma estratégia para modificar a superfície da hidroxiapatita com *Pluronic*[®] e subsequente incorporação

do alendronato. As Tabelas 8 e 9 descrevem as características dos *Pluronic*[®] utilizados e das amostras preparadas respectivamente.

Tabela 8 - Características dos *Pluronic*[®] utilizados no experimento.

<i>Pluronic</i> [®]	Massa Molar (g/mol)	Razão em massa de PPO (%)	Razão em massa de PEO (%)	Balanco lipofílico/hidrofílico (HLB)
F68	8400	6%	80%	>24
F108	14600	10%	80%	>24
F127	12600	12%	70%	18-23

Fonte: Autor.

Tabela 9 - Características das amostras preparadas.

Amostra (nome)	<i>Pluronic</i> [®]	Alendronato (% em p/p)
F68AL2	F68	2%
F108AL2	F108	2%
F127AL2	F127	2%

Fonte: Autor.

Para todas as amostras adicionou-se 1g de *Pluronic*[®] em um béquer, que foi aquecido em banho maria sob agitação magnética, em temperaturas um pouco acima de seus respectivos pontos de fusão (Tabela 5), até que todo o material fundisse. Então 20mg de alendronato foram adicionados e a mistura foi mantida nas mesmas condições por mais 30 minutos. A mistura então foi desgasificada em um dissecador a vácuo, e seca a temperatura ambiente, ao final foi obtido um monolito.

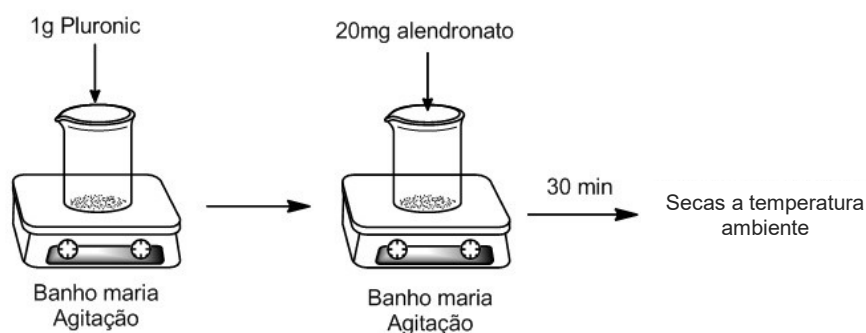


Figura 14 - Esquema da síntese das matrizes poliméricas com alendronato.

Fonte: Autor.

3.3 Preparação do compósito hidroxiapatita-alendronato

3.3.1 Preparação do molde de esferas de sílica

As esferas de sílica foram preparadas através das reações de hidrólise e condensação do tetraetilortossilicato (TEOS), em meio básico, adicionando uma mistura de água, hidróxido de amônio e etanol (método de Stöber (75), modificado por Gieshe(126)). O processo consistiu em adicionar em um erlenmeyer, 11mL de TEOS e 12mL de etanol (solução A) e em outro erlenmeyer, foi adicionado 15mL de etanol, 9 mL de água destilada e 3 mL de hidróxido de amônio 30% (solução B) as duas soluções foram então aquecidas a 40 °C em banho maria por 15 min. Passado esse período, a solução A foi adicionada a solução B e mantida sob agitação a 40°C por mais 2h. As esferas de sílica obtidas foram centrifugadas, lavadas com água destilada e redispersadas com o uso de ultrassom por 10 minutos, o procedimento foi repetido pelo menos por três vezes. Finalmente as esferas foram secas a 50°C por 12h. Para se obter esferas com tamanhos diferentes a quantidade de água foi variada, quanto maior a quantidade de água, menor o tamanho das esferas. Foram preparadas duas amostras de esferas de sílica, que foram nomeadas como S200 e S400 devido aos seus diâmetros médios de aproximadamente 200nm e 400nm respectivamente. Os histogramas das esferas foram preparados através da contagem de 200 esferas nas microscopias eletrônicas de varredura utilizando o programa Image J.

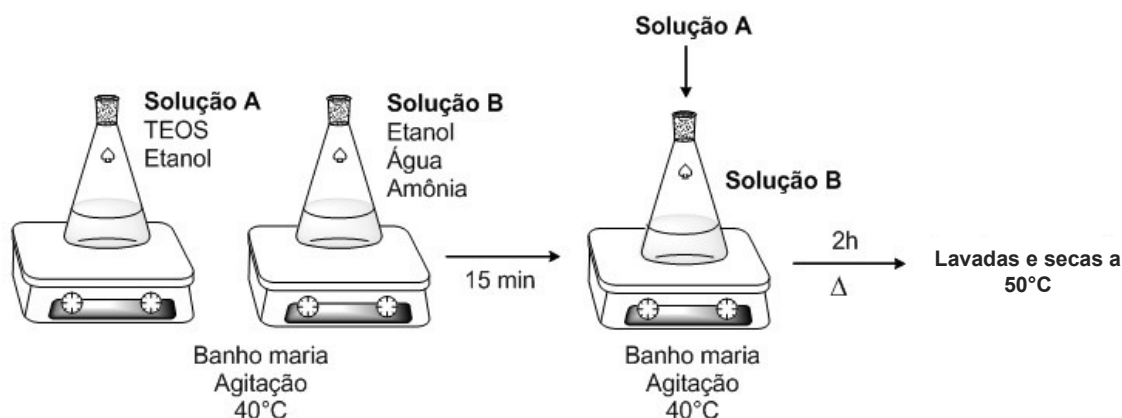


Figura 15 - Esquema da síntese das esferas de sílica.

Fonte: Autor.

Utilizando as esferas de sílica obtidas previamente, 1g destas foram dispersas em um béquer contendo 50mL de etanol e mantidas sob agitação magnética constante por 1h. A mistura resultante foi então mantida em sedimentação gravitacional a temperatura ambiente até a obtenção do molde empacotado de esferas. O molde então foi seco a 100°C por 12h e depois calcinado a 500°C por 1h. Foram preparados dois moldes empacotados, um com as esferas S200 que foi nomeado como TP200 e outro com as esferas S400 que foi nomeado como TP400.

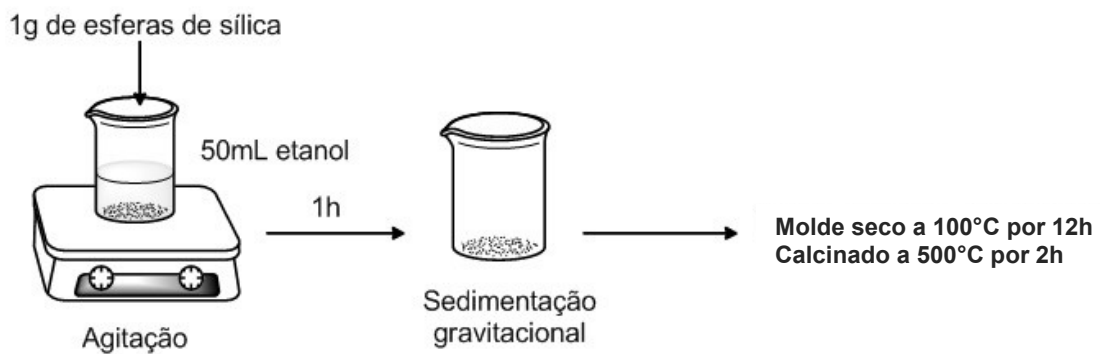


Figura 16 - Esquema da preparação do molde de esferas de sílica.
Fonte: Autor.

3.3.2 Preparação do molde (*scaffold*) de hidroxiapatita porosa

Para a preparação do precursor de hidroxiapatita (HA), foi utilizado o método sol-gel. Em um balão foi adicionado de 5g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 7,6mL de etanol, a solução foi mantida sob agitação e foi aquecida até 80°C, ao chegar nesta temperatura foi adicionado lentamente 1,9mL de trimetilfosfato. A solução então foi mantida nesta temperatura por mais 24h. Uma parte desse gel precursor foi precipitado, seco a 100°C por 12h e tratado termicamente a 700°C por 2h, o pó de HA obtido foi nomeado de HAP.

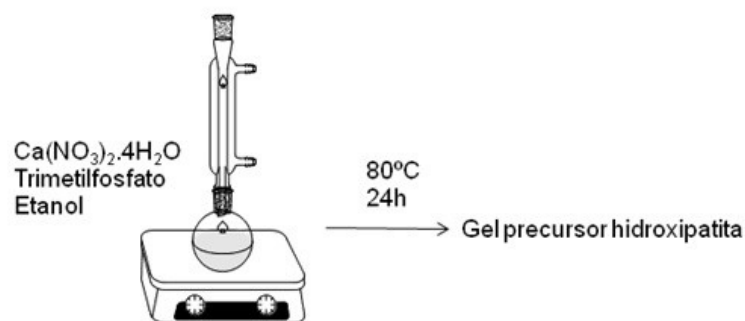


Figura 17 - Esquema da síntese do gel precursor de HA.
Fonte: Autor.

Tendo preparado o molde de esferas de sílica e o precursor de hidroxiapatita estes foram usados para preparar o fosfato de cálcio poroso. Assim o molde de sílica foi infiltrado em um béquer contendo a solução de precursor de hidroxiapatita e depois de removido este foi secado a 100°C por 12h. O molde/precursor de HA foi então calcinado a 700°C por 2h para a formação da fase HA. Finalmente a sílica foi removida pela imersão do molde/precursor de HA em uma solução de NaOH 5mol.L⁻¹ por 1 dia. O fosfato de cálcio poroso obtido foi então lavado com água destilada e seco a 50 °C por 12h. Foram obtidos dois moldes com tamanhos de poros diferentes, estes foram nomeados conforme o tamanho das esferas de sílica utilizadas como molde, HA400 (sílica 400nm) e HA200 (sílica 200nm).

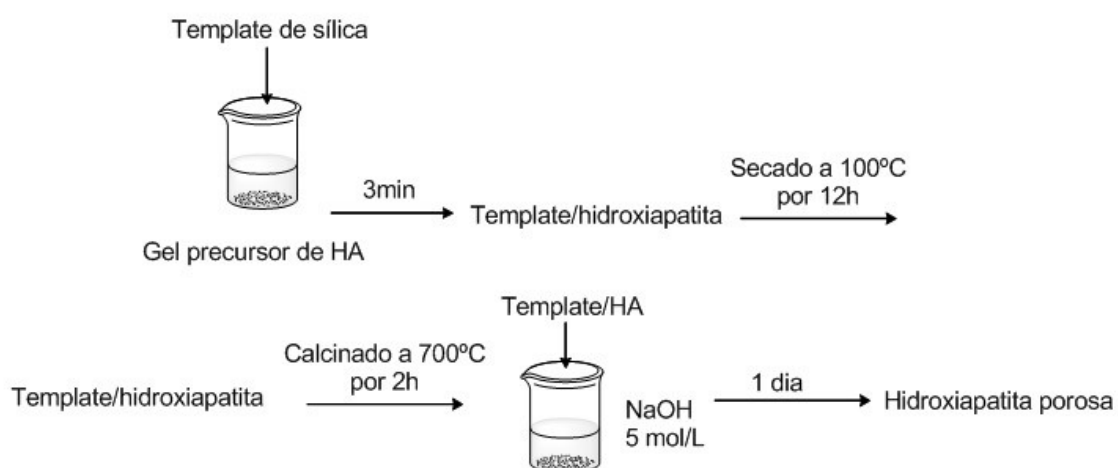


Figura 18 - Esquema da síntese da HA porosa.

Fonte: Autor.

3.3.3 Preparação do compósito hidroxiapatita-alendronato

Em um *ependorf* foi adicionado 0,1g da amostra de hidroxiapatita porosa. Uma solução de alendronato (10mg/mL) foi preparada previamente e 1mL dessa solução foi adicionado ao *ependorf*. A mistura foi encubada a 200 rpm durante 24h a 37°C para a formação de uma ligação entre os cristais da hidroxiapatita e o fármaco. Subsequentemente o compósito hidroxiapatita-alendronato foi lavado com água e centrifugado a 9000rpm por 4 minutos para remover o fármaco que ficou apenas adsorvido fisicamente, depois da terceira lavagem o sobrenadante foi

retirado e o precipitado congelado. As amostras então foram liofilizadas e

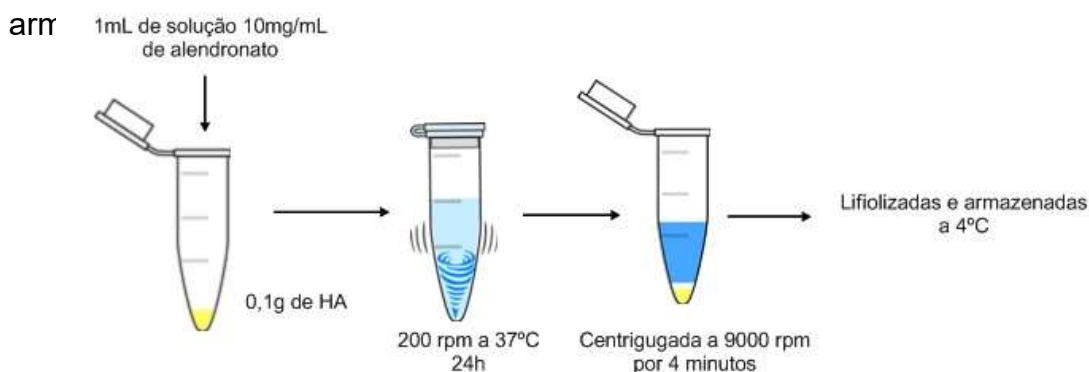


Figura 19 - Esquema da preparação do composto hidroxiapatita-alendronato.

Fonte: Autor.

As amostras preparadas e suas características estão listadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Características das amostras preparadas.

Amostra (nome)	Hidroxiapatita	Proporção HA/AL (p/p)
HA400AL	Porosa (poro 400nm)	10:1
HA200AL	Porosa (poro 200nm)	10:1
HAPAL	Pó (cristalito 100nm)	10:1

Fonte: Autor.

3.4 Preparação do composto hidroxiapatita-polímero-alendronato

100mg de *Pluronic*[®] foi adicionado em um béquer, este foi aquecido em banho maria sob agitação magnética até que todo o material fundisse, então adicionou-se o 10mg de alendronato. Depois que todo o fármaco foi solubilizado no polímero adicionou-se 100mg de hidroxiapatita porosa, a mistura foi então mantida sob agitação por mais 30 minutos. Por último a mistura então foi desgasificada em um dissecador a vácuo, e seca a temperatura ambiente.

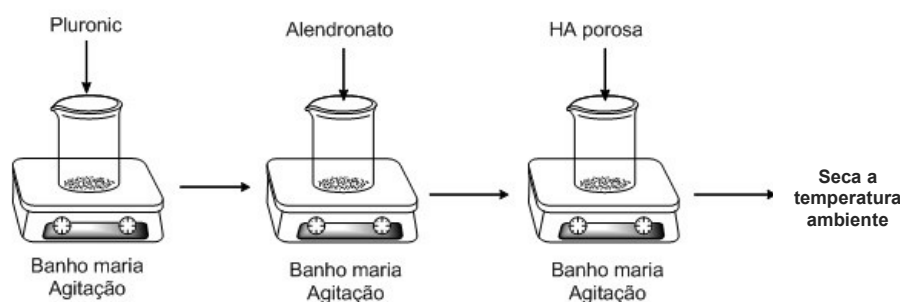


Figura 20 - Esquema da síntese do composto HA-polímero-AL.
Fonte: Autor.

As amostras preparadas e suas características estão listadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Características das amostras de biocompósitos preparadas.

Amostra (nome)	Proporção Hidroxiapatita (p)	Proporção Polímero (p)	Proporção Alendronato (p)
F108HA400AL	10	10	1
F108HA200AL	10	10	1
F108HAPAL	10	5	1

Fonte: Autor.

3.5 Ensaios de liberação de fármaco - determinação do alendronato pelo método da ninidrina

O alendronato é um fármaco que não possui absorvância no UV-Visível, por isso para utilizar este tipo de espectroscopia em sua determinação se faz necessário o uso de métodos indiretos. Desta maneira usou-se o método da ninidrina (2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona), usado na detecção de amins primárias e aminoácidos, para a quantificação do alendronato. O alendronato que contém um grupo amina primária reage com a ninidrina em presença de bicarbonato de sódio. A reação se dá via desaminação oxidativa da amina livre, o grupo formado irá condensar com a forma reduzida da ninidrina para a formação de um produto colorido conhecido com púrpura de Ruhemmen o qual possui um máximo de absorvância em 568nm (127). A Figura 21 ilustra o possível mecanismo de reação da ninidrina com o alendronato.

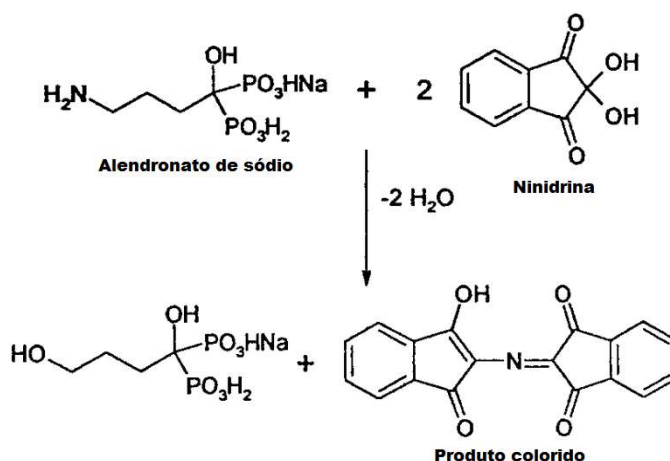


Figura 21 - Possível mecanismo de reação entre o alendronato e a ninidrina.
Fonte: TAHA; YOUSSEF (2003, p.1446) (127).

3.5.1 Construção da curva de calibração

Primeiramente foi preparada uma solução estoque de alendronato com concentração de 10mg/mL. Alíquotas diferentes da solução estoque foram adicionadas em tubos de ensaio de 10mL para a obtenção de uma concentração final de 5, 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de alendronato. Depois foram adicionados em cada tubo 0,5mL de uma solução de bicarbonato de sódio 0,05M e 2,5mL de uma solução de 0,2% de ninidrina em metanol. Os tubos foram aquecidos em banho maria a $90\pm 5^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Depois de resfriados a temperatura ambiente foi adicionada água destilada até completar a marca de 10mL. A absorbância das amostras foi medida em 568nm, não ultrapassando o intervalo de 30 minutos entre a preparação e a medida visto que o produto colorido é estável por pelo menos 1h.

3.5.2 Determinação da quantidade de alendronato incorporada na hidroxiapatita

Após a preparação do compósito hidroxiapatita-alendronato e antes da lavagem, 100 μl do sobrenadante foram retirados de cada amostra. Para a determinação do alendronato no sobrenadante foi realizado o mesmo método descrito na curva de calibração. Logo, a quantidade inicial de alendronato adicionada nas amostras menos a quantidade de alendronato obtida no sobrenadante é a quantidade de alendronato que se ligou na hidroxiapatita (Equação 3).

$$Q_{incorporada} = Q_{ALN\ inicial} - Q_{ALN\ sobrenadante} \quad (3)$$

3.5.3 Curva de liberação matriz polimérica-alendronato, hidroxiapatita-alendronato e hidroxiapatita-polímero-alendronato

Para a preparação de curva de liberação 20mg de cada amostra foram adicionadas em um *ependorf* juntamente com 1mL de tampão fosfato pH 7,4, as amostras foram então encubadas a 37°C e alíquotas de 100µl foram retiradas em tempos determinados, sendo que a cada alíquota retirada a mesma quantidade de tampão novo era adicionada. A quantidade de alendronato de cada alíquota foi determinada pelo método da ninidrina.

3.6 Técnicas de caracterização

Para avaliar a forma, a estrutura, o tamanho, estabilidade, cristalinidade entre outros parâmetros das amostras sintetizadas foi necessário o uso de algumas técnicas de caracterização.

3.6.1 Difractometria de raios X (DRX)

O método de difração de raios X permite a determinação das posições dos átomos e íons que constituem um composto iônico ou molecular, permitindo assim a descrição das estruturas cristalinas em termos de detalhes, tais como comprimento de ligação, ângulos e posições relativas de íons e moléculas em uma célula unitária (128).

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um equipamento Rigaku Rint 2000 (IQ-UNESP Araraquara), com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), e as seguintes condições de trabalho: voltagem 40 kV, corrente 40 mA, velocidade de varredura de $0,2 \text{ }^\circ \text{ min}^{-1}$. As amostras foram preparadas a partir da amostra sólida em porta amostras de vidro. A equação de Bragg (Equação 4) que relaciona o comprimento do espaçamento entre camadas (d) e o ângulo de incidência dos raios X no cristal (θ) foi utilizada (129).

$$2d\text{sen}\theta = n\lambda \quad (4)$$

onde λ é o comprimento de onda dos raios X.

As análises por DRX permitem também estimar uma importante característica de nanomateriais, que é o tamanho de cristalito das partículas formadas, através da Lei de Scherrer (129) expressa na Equação 5:

$$d_m = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta_B} \quad (5)$$

onde d_m é o diâmetro médio dos cristalitos, k é o fator de correção (0,9 para partículas esféricas), θ_B é o ângulo de difração de Bragg do pico com intensidade relativa de 100% e β é a largura a meia altura, dada em radianos. Esta lei relaciona a largura à meia altura do pico de raios X com o diâmetro médio das partículas e sabe-se que quanto mais alargado estão os picos do difratograma menor será o tamanho médio das partículas.

3.6.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura fornece informações topográficas tridimensionais desde espécimes em *bulk* até materiais nanométricos (130). Ou seja, obtêm-se imagens da morfologia externa dos materiais similares aquelas vistas pelo olho humano. A obtenção de uma imagem por um microscópio eletrônico é feita através de um procedimento semelhante ao usado por um microscópio óptico convencional, mas ao invés de se utilizar fótons da luz visível, os microscópios eletrônicos usam feixes de elétrons. Nestes instrumentos, feixes de elétrons são acelerados através de uma diferença de potencial de 1 a 200kV, e para focar os elétrons, são empregados campos elétricos e magnéticos. Para análise de MEV, as amostras necessitam ser condutoras, pois de outra forma os elétrons podem se acumular na amostra e interagir com o próprio feixe de elétrons, resultando numa perda de definição da imagem. Assim, as amostras não-condutoras devem ser recobertas com uma fina camada de metal, geralmente ouro ou alumínio(128).

As micrografias eletrônicas de varredura desse trabalho foram realizadas em um microscópio TOPCOM modelo SM-300 (IQ-UNESP Araraquara) operando a 20kV. Todas as amostras foram depositadas em porta amostras de alumínio e recobertas com ouro. Os histogramas foram obtidos medindo-se o diâmetro médio de cerca de 200 nanopartículas nas micrografias obtidas.

3.6.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Através do espectro na região do infravermelho podemos obter informações sobre as vibrações moleculares, ou seja, as deformações e os estiramentos das ligações nas moléculas. O espectro vibracional de um composto é obtido pela exposição da amostra à radiação infravermelha, e pelo registro da variação da transmissão com a frequência (ou número de onda) (131).

Para a análise de espectroscopia na região do infravermelho a maioria das amostras foram diluídas em KBr na proporção de 10:1 e foram analisadas em um espectrometro FTIR Vertex 70 da Bruker (IQ-UNESP Araraquara) usando o acessório EasiDiff (Pike Technology) de reflectância difusa em uma faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Para algumas amostras foram preparados discos prensados em KBr e analisadas um espectrômetro FTIR-IR Perkin Elmer - Frontier (IQ-UNESP Araraquara), e faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

3.6.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Análises térmicas têm como definição um grupo de técnicas em que se mede uma propriedade física de uma substância, ou de seus produtos de reação em função da temperatura, enquanto essa substância se submete a um programa controlado de temperatura. No caso do DSC, se medem as diferenças na quantidade de calor fornecida, a uma substância e a uma referência, em função da temperatura da amostra, quando as duas estão submetidas a um programa controlado de temperatura(132). Por meio do DSC é possível determinar a estabilidade térmica bem como determinar as temperaturas de eventos térmicos das amostras, como ponto de fusão, transição vítrea, entre outros.

Os termogramas das amostras foram obtidos em um DSC STAR eSW 8.10 (IQ-UNESP Araraquara). Aproximadamente 10mg de amostra foram colocadas em porta amostras de alumínio e as amostras foram aquecidas de 0 a 350°C em uma taxa de 10°C/min sob fluxo de nitrogênio em 50mmHg.

3.6.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) é utilizada na medida do tamanho de partículas. Partículas se difundem em solução em movimentos aleatórios (movimento browniano) e o diâmetro medido pelo DLS é denominado diâmetro hidrodinâmico, pois é tratado como diâmetro de uma esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão da partícula. O tamanho de uma partícula (diâmetro hidrodinâmico) é calculado através do coeficiente de difusão translacional, utilizando a equação de Stokes-Einsten (Equação 6) (133):

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (6)$$

onde é k a constante de Boltzman ($1.3806503 \times 10^{-23} \text{m}^2 \text{kg s}^{-2} \text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K), η é a viscosidade (mPa s), e D é o coeficiente de difusão ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). O coeficiente de difusão translacional não depende apenas do tamanho da partícula, mas também da força iônica, uma vez que a velocidade de difusão de uma partícula depende da espessura da dupla camada elétrica. Por exemplo, uma dupla camada elétrica espessa diminui a velocidade de difusão resultando em diâmetro hidrodinâmico aparente maior. Esta técnica tem como finalidade avaliar o tamanho médio das partículas suspensas com a variação da força iônica do meio(134).

O tamanho das partículas foi determinado por espalhamento de luz dinâmico utilizando um equipamento NANO SIZE ZS (IQ-UNESP Araraquara). As amostras foram suspensas em água destilada e homogeneizadas com ultrassom durante 15 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e caracterização das matrizes poliméricas com alendronato

4.1.1 Introdução

Na primeira etapa deste trabalho, foram sintetizadas apenas matrizes dos diferentes copolímeros com o alendronato, a fim de determinar qual polímero seria melhor para a modificação da HA, ou seja, qual polímero apresentaria uma melhor interação com o fármaco e conseqüentemente um comportamento de liberação mais interessante.

Sendo assim, as amostras de *Pluronic*[®] com alendronato foram preparadas por meio do método de dispersão sólida (Figura 22(a) estrutura molecular do alendronato e (b) estrutura molecular genérica dos copolímeros de PEO/PPO). Este método é muito utilizado para aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis. Existem tipos diferentes de dispersões sólidas dependendo do estado físico do fármaco e da matriz carreadora. Estas podem ser amorfas ou cristalinas, uma dispersão de um fármaco amorfo ou cristalino em uma matriz amorfa ou cristalina, ou ainda uma combinação de solução e dispersão de sólidos (83,135). Algumas dispersões cristalinas podem ser misturas eutéticas, e nesse caso há um significativo aumento da dissolução do fármaco pouco solúvel na matriz (136,137).

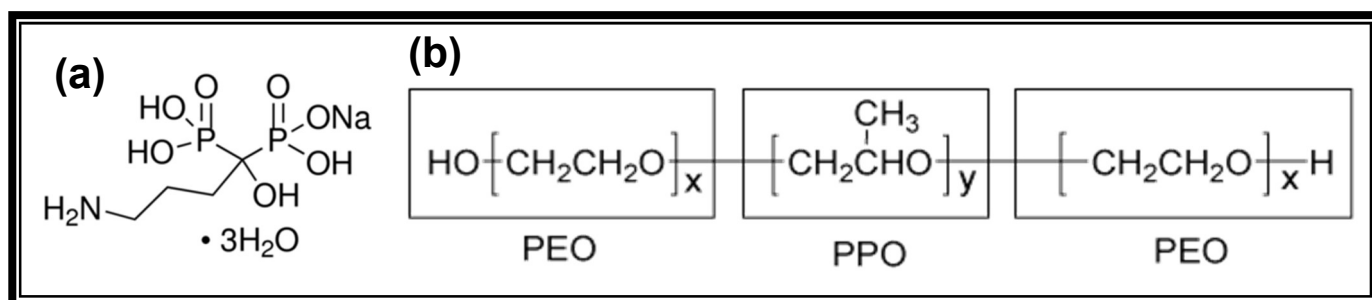


Figura 22 - (a) estrutura molecular do alendronato e (b) estrutura molecular genérica dos copolímeros de PEO/PPO.

Fonte: Autor.

Quando se aquece um fármaco tem se que levar em consideração uma possível mudança de fase cristalina e a possível formação de um polimorfo. Polimorfismo é a capacidade de uma molécula adquirir mais de uma forma ou estrutura cristalina, nesse caso os polimorfos podem possuir diferenças que alterem a qualidade e eficácia terapêutica do medicamento, tendo um efeito antagônico e/ou tóxico (138). O alendronato utilizado neste trabalho é uma forma trihidratada, na literatura além da forma trihidratada foram reportadas a forma anidra e diversos intermediários hidratados, todas as formas cristalinas polimorfas do alendronato são adequadas para uso farmacêutico, mantendo seu efeito farmacológico relacionado à inibição da calcificação e reabsorção óssea (139–141).

4.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A primeira caracterização realizada nas amostras foi a de espectroscopia na região do infravermelho. A Figura 23 ilustra os espectros de infravermelho para o alendronato, para os polímeros e para as três amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2.

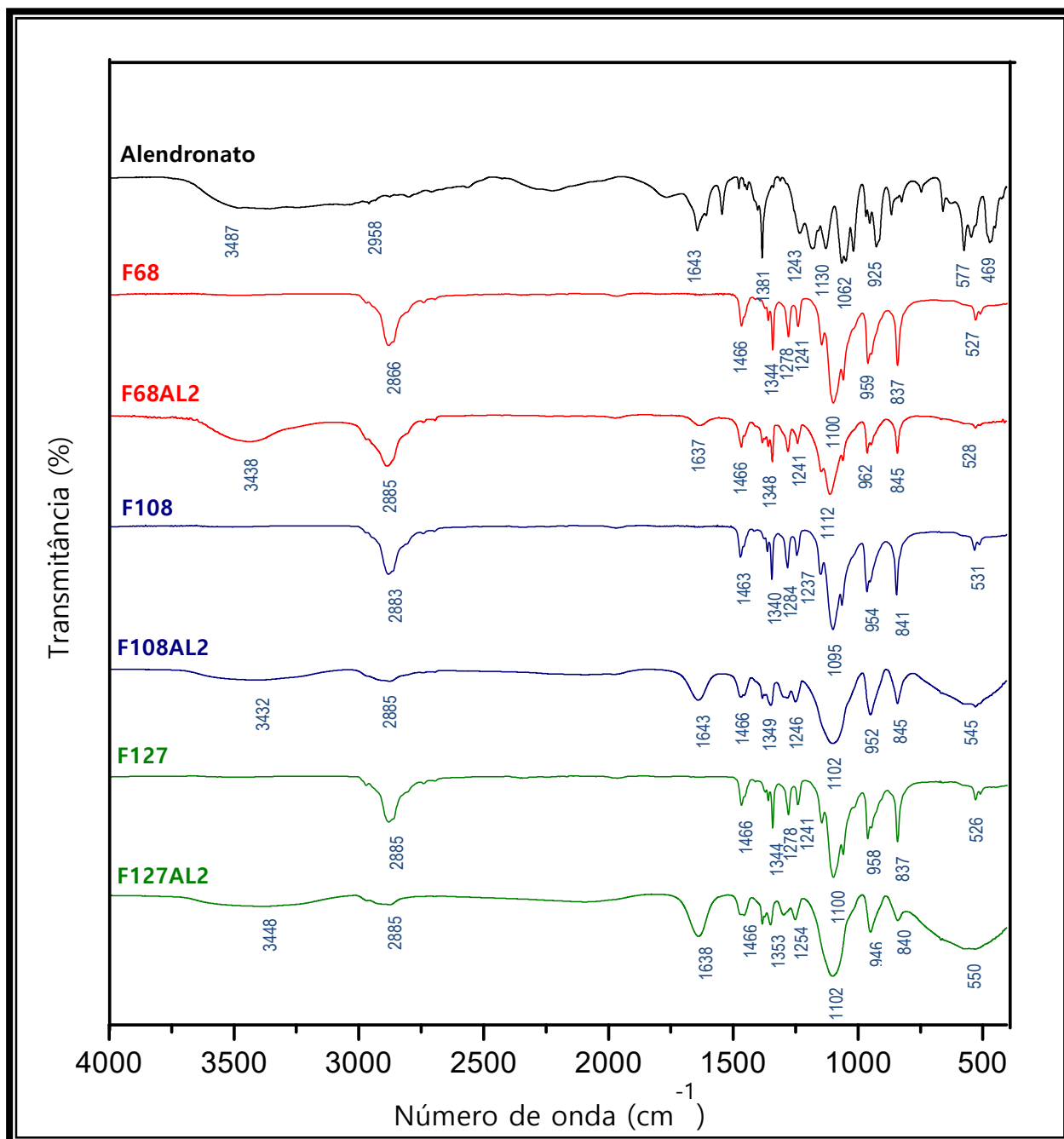


Figura 23 - Espectro de absorção na região do infravermelho do alendronato, polímeros F68, F108 e F127 e das amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2.

No fármaco foi possível atribuir bandas pertencentes aos grupos fosfato (P-O - 469, 544, 577, 925, 1016 cm⁻¹) (142,143), C-O (1062 cm⁻¹) (131), amina primária (NH₂ - 1643 cm⁻¹) (131,144), C-H das cadeias carbônicas (1381 e 2958 cm⁻¹) (131) e OH (3487 cm⁻¹). Já as bandas em 1130, 1182, 1243 cm⁻¹ podem ser referentes a deformação axial da ligação C-N (amina), a deformação axial da ligação C-P (cadeias carbônicas com fosfato) e a deformação angular da ligação H-O-P (grupos

fosfato) (145). No espectro dos três polímeros, observa-se bandas referentes às cadeias carbônicas (deformações angulares C-H entre 1150 e 1500 cm^{-1} , vibração axial C-C entre 800 e 1200 cm^{-1} , deformação axial C-H entre 3000 e 2840 cm^{-1}), as vibrações referentes ao grupamento éter (deformação axial C-O-C entre 1085 e 1150 cm^{-1}) e álcool (deformação axial C-O entre 1000 e 1200 cm^{-1} , deformação angular O-H entre 1420 e 1330 cm^{-1}) (131).

Observa-se que os espectros das três amostras são bem semelhantes entre si. As bandas que eram provenientes da deformação angular do grupo fosfato presentes no AL formam agora apenas uma banda larga com número de onda 528, 545 e 550 cm^{-1} para as amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2 respectivamente. As bandas entre 800 e 1200 cm^{-1} , são mais difíceis de atribuir, pois é uma região com muitas bandas tanto do fármaco como dos polímeros, entretanto observa-se nas amostras que o perfil das bandas é mais parecido com os dos polímeros, destacando-se a banda referente à deformação axial C-O-C em 1112, 1102, 1102 cm^{-1} para as amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2 respectivamente. Pode-se confirmar a presença do fármaco nas matrizes, a partir da presença da banda da deformação angular N-H, que foi observada em todas as amostras em 1637, 1643 e 1638 cm^{-1} para as amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2. (131,144). Apesar da análise não ser quantitativa, observou-se que a intensidade da banda N-H para a amostras F68AL2 foi menor em relação as outras amostras. Entre 1200 a 1500 cm^{-1} atribui-se as bandas provenientes da deformação angular C-H e em 2885 cm^{-1} a deformação axial C-H que podem ser tanto dos *Pluronic*[®] quanto do AL visto que os dois reagentes possuem cadeias carbônicas.

4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

Dando continuidade a caracterização das amostras, suas morfologias foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 24 (a), (b) e (c) corresponde às micrografias do alendronato. Observa-se que o fármaco é formado por cristais na faixa de tamanho entre 60 e 200 μm . A Figura 24 (d), (e) e (f) corresponde às micrografias da amostra F68AL2, observa-se que após a fusão dos reagentes houve a formação de uma matriz polimérica a qual se estende por toda amostra, fragmentos menores que se espalham pela matriz podem ser atribuídos aos cristais do fármaco que acabaram sendo solubilizado. Resultados semelhantes

foram obtidos para as outras duas amostras F108AL2 (Figura 24 (g), (h) e (i)) e F127AL2 (Figura 24 (j), (l) e (m)).

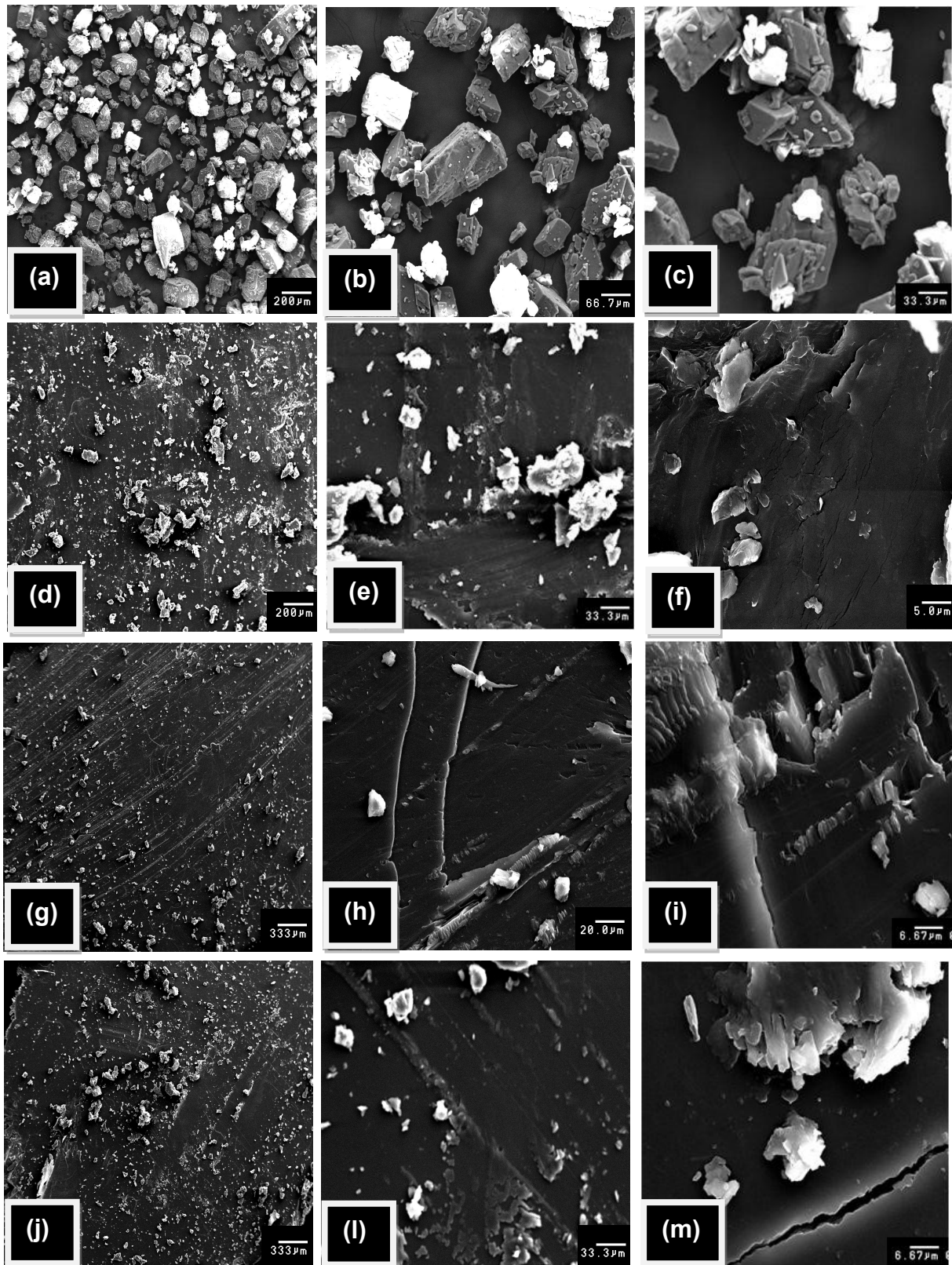


Figura 24 – Micrografias eletrônicas de varredura do alendronato (a), (b) e (c) amostra F68AL2 (d), (e) e (f), amostra F108AL2 (g), (h) e (i) e amostra F127AL2 (j), (l) e (m).

Fonte: Autor.

Os resultados das duas análises indicam que o método da dispersão sólida é eficaz na incorporação do fármaco alendronato quando usada uma matriz formada pelo copolímero de PEO/PPO (*Pluronic*[®]). Entretanto não foi possível determinar em qual amostra a interação fármaco/polímero foi melhor, o que se espera obter nas análises como difratometria de raios X e análise térmica.

4.1.4 Difractometria da Raios X

Na análise de difratometria de raios X foram obtidos os difratogramas do fármaco (AL) e das amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2 que estão ilustrados na Figura 25. A Figura 26 representa uma aproximação de todos os difratogramas sobrepostos na faixa de 5 a 20° 2 θ .

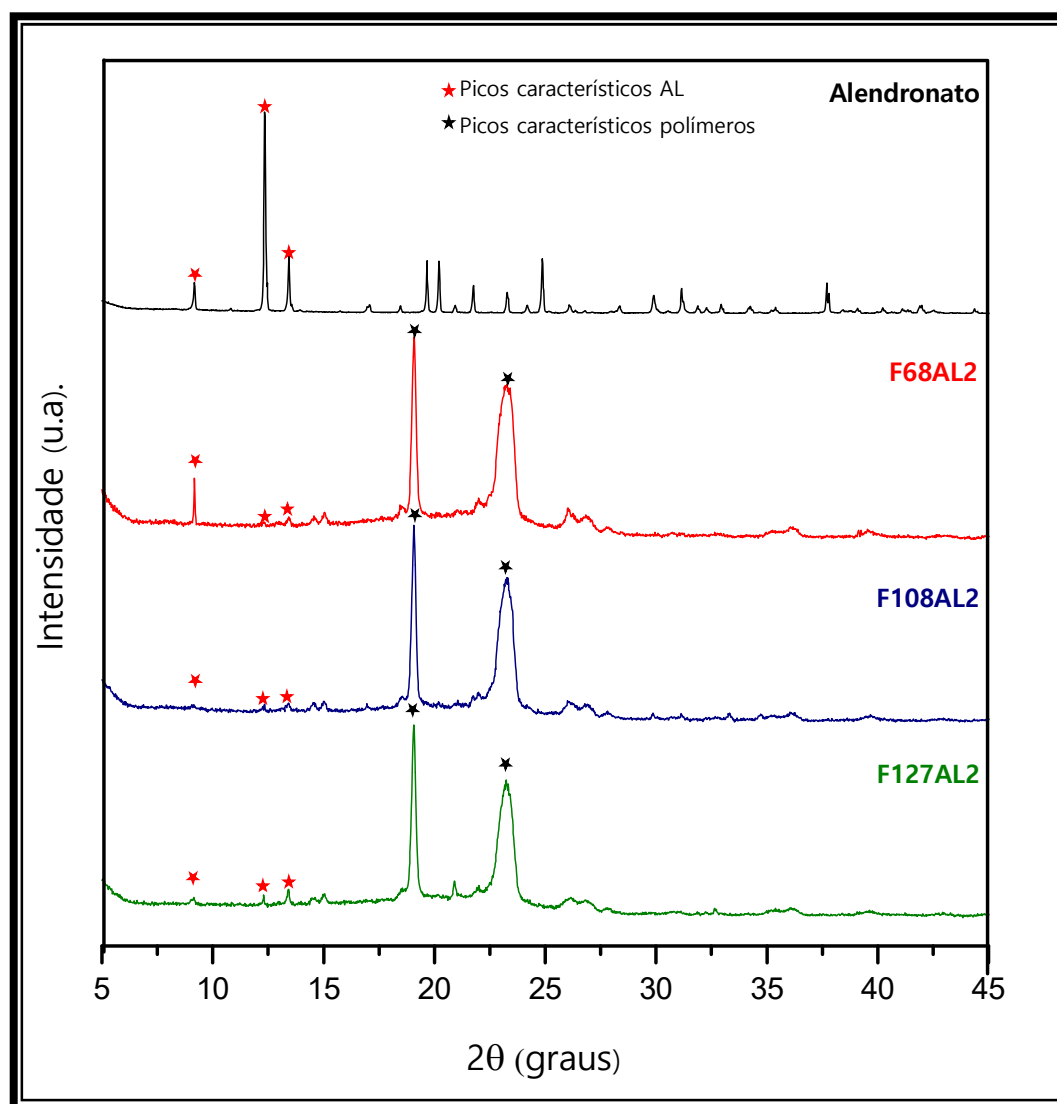


Figura 25 - Difractogramas de raios X das amostras alendronato, F68AL2, F108AL2 e F127AL2.
Fonte: Autor.

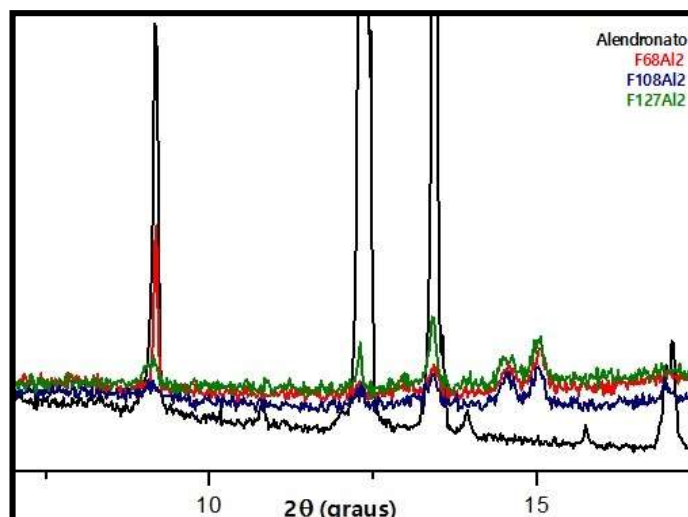


Figura 26 - Difrátogramas de raios X das amostras alendronato, F68AL2, F108AL2 e F127AL2 sobrepostos e na faixa entre 5 a 20° 2 θ .

Fonte: Autor.

Na Figura 25 os asteriscos em vermelhos destacam os picos característicos do fármaco, e os pretos dos copolímeros. Os picos mais intensos em 19,20 e 23,30° 2 θ destacados em todas as amostras são provenientes dos polímeros cristalinos (F68, F108 e F127). Observa-se que os picos em 9,16; 12,34 e 13,44° 2 θ característicos do fármaco também estão presentes nas amostras, porém com menor intensidade. A diminuição na intensidade dos picos pode ser atribuída à baixa concentração do alendronato nas amostras, a intensidade dos picos do polímero acabam mascarando os picos do fármaco.

Entre as amostras, em relação ao pico em 9,16° 2 θ referente ao fármaco, observa-se que há um aumento de sua intensidade na seguinte ordem F68AL2>F127AL2>F108AL2. Para a amostra F68AL2 a intensidade do pico é maior que a do próprio fármaco, esperava-se que a incorporação do alendronato favorecesse a cristalização do polímero. A explicação para o aumento da intensidade pode estar relacionado com orientação preferencial. Com a incorporação do alendronato, o fármaco passou a interagir com o plano cristalino do polímero F68 referente ao pico em 9,16° 2 θ o que causou o aumento da sua intensidade. Interessante citar também que esta amostra foi a que apresentou uma menor intensidade da banda de deformação angular da amina referente ao alendronato na análise de espectroscopia na região do infravermelho.

Em relação as outras amostras, a menor intensidade do pico, pode ser atribuída a hidrofiliidade e massa molecular dos *Pluronic*[®], que podem afetar a dispersibilidade do alendronato e o seu grau de mistura com o copolímero. A porção hidrofílica pode promover a formação de soluções sólidas. Sendo assim, esse resultado pode indicar que na amostra F108AL2, o alendronato se encontra melhor disperso na matriz polimérica, em um estado de solução sólida. Comparando as características dos polímeros esse resultado é muito coerente visto que o polímero F108 apresenta a maior massa molar e a maior porção do monômero hidrofílico PEO, já o F68 apresenta a menor massa molar e a menor porção de PEO.

Muitos trabalhos destacam a diminuição da cristalinidade do fármaco quando o método da dispersão sólida é utilizado. Fathy e El-Badry (146) em seu estudo utilizaram *Pluronic*[®] com piroxicam e prepararam dispersões sólidas com diferentes concentrações, os resultados dos difratogramas geraram duas hipóteses: em baixas concentrações de fármaco há uma diminuição de suas propriedades cristalinas, ou o fármaco se encontra em um estado de solução sólida dentro da matriz polimérica. Já no trabalho de Mudit et al. (147) que utiliza o *Pluronic*[®] F127 com celecoxibe, o difratograma de raios x da amostra, com razão de polímero/fármaco 5:1(m/m) mostrou um alargamento e redução do pico principal do fármaco, indicam que a maior parte deste se encontra em uma forma amorfa na matriz polimérica. Apenas com a difração de raios X não foi possível determinar se houve uma diminuição na cristalinidade do fármaco nas amostras. Alargamentos das linhas de difração podem ser utilizados como um indicador da cristalinidade da amostra (148). Entretanto como as intensidades dos picos do alendronato estão muito baixas, não foi possível realizar uma comparação com o difratograma do fármaco.

4.1.5 Calorimetria exploratória diferencial

Como última caracterização foram realizadas medidas de calorimetria exploratória diferencial em todas as amostras. A Figura 27 ilustra os termogramas do fármaco, dos polímeros F68, F108, F127 e das amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2. A Tabela 12 resume os eventos térmicos suas atribuições.

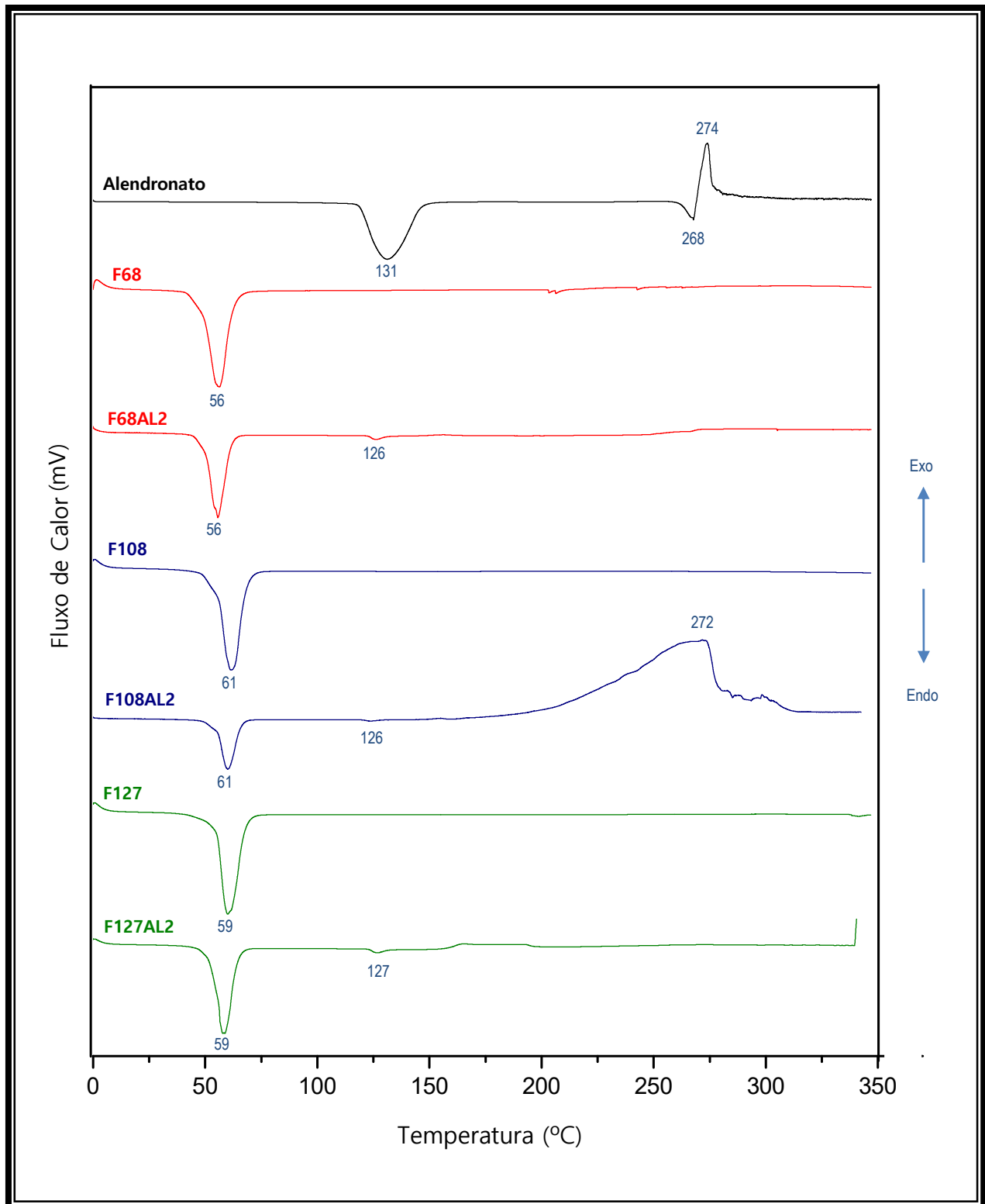


Figura 27 - Curvas de DSC das amostras alendronato, F68, F68AL2, F108, F108AL2, F127, F127AL2.

Fonte: Autor.

Tabela 12- Atribuição dos eventos térmicos para as diferentes amostras.

Amostras	Evento 1			Evento 2			Evento 3		
	Tipo	T(°C)	Atribuição	Tipo	T(°C)	Atribuição	Tipo	T(°C)	Atribuição
F68	Endo	56	Fusão	-	-	-	-	-	-
F108	Endo	61	Fusão	-	-	-	-	-	-
F127	Endo	59	Fusão polímero	-	-	-	-	-	-
AL	Endo	131	Perda de água de hidratação	Endo	268	Fusão	Exo	274	Decomposição
F68AL2	Endo	56	Fusão (F68)	Endo	126	Perda de água de hidratação (AL)	-	-	-
F108AL2	Endo	61	Fusão (F108)	Endo	126	Perda de água de hidratação (AL)	Exo	272	Decomposição
F127AL2	Endo	59	Fusão F127	Endo	127	Perda de água de hidratação (AL)	-	-	-

Fonte: Autor.

Observa-se que o alendronato apresenta três eventos térmicos principais, o primeiro evento a 131°C corresponde à perda de água de hidratação da molécula (3 moléculas de água, o fármaco é trihidratado), o segundo evento endotérmico em 268°C corresponde ao ponto de fusão e o último evento exotérmico em 274°C a decomposição do fármaco (149). Os polímeros apresentam um único evento térmico principal, que corresponde aos seus pontos de fusão, estes se encontram em 56, 61 e 59°C para os polímeros F68, F108 e F127 respectivamente. Para a primeira amostra F68AL2 destacam-se dois eventos térmicos, um em 56°C que corresponde ao ponto de fusão do polímero F68 e outro em 126°C que corresponde à perda de água de hidratação do alendronato. A segunda amostra F108AL2 possui três eventos térmicos principais, o primeiro em 61°C correspondente a fusão do polímero, em 126°C perda da água de hidratação do fármaco e a 272°C provavelmente da decomposição da amostra mais especificamente do alendronato. Na última amostra F127AL2, destacam-se dois eventos térmicos, que são do ponto de fusão do polímero e da perda da água de hidratação do fármaco em 59 e 127°C, respectivamente como nas outras amostras.

A partir dos resultados obtidos na análise de DSC foi possível observar que as amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2 possuem um evento térmico relacionado ao ponto de fusão do polímero e outro evento relacionado a perda de água de

hidratação do alendronato. No primeiro evento todos os pontos de fusão foram encontrados nas mesmas temperaturas que as dos polímeros, indicando que a cristalinidade dos polímeros não foi alterada durante a síntese. Em relação ao alendronato o evento térmico atribuído a sua desidratação se encontra deslocado em todas as amostras, fato que indica uma menor cristalinidade do fármaco dentro da matriz polimérica. A presença dos dois eventos nas amostras tanto do polímero quanto do fármaco também indica que não há ligação química entre o alendronato e os polímeros.

Yuasa et. al. (150) em seu trabalho utilizou o método da dispersão sólida para preparar grânulos de hidroxipropil celulose com fluorbiprofeno. Em suas análises de DSC ele atribuiu a perda de cristalinidade do fármaco ao método de preparação, provavelmente a droga passa de um estado cristalino para um estado amorfo devido ao aumento da mobilidade molecular durante o processo de aquecimento. Apesar das análises indicarem uma menor cristalinidade do alendronato, a presença de fases mais amorfas apenas afeta a solubilidade do fármaco. As formas amorfas são geralmente mais solúveis que as formas cristalinas e possuem maior velocidade de dissolução.

A amostra F108AL2 foi à única que apresentou um evento exotérmico em 272°C devido à decomposição da amostra. Esse resultado pode indicar uma melhor interação do alendronato com o polímero F108, corroborando com o resultado obtido na difração de raios x. O qual mostrou que a amostra F108AL2 apresentou a menor intensidade no pico em $9,16^\circ 2\theta$. A menor intensidade está relacionada com a maior hidrofiliabilidade desse polímero em relação aos outros. Uma maior porção hidrofílica aumenta o grau de mistura e dispersibilidade do fármaco na matriz.

4.1.6 Curvas e cinética de liberação do alendronato

Depois da etapa de caracterização de todas as amostras, foram realizadas as curvas de liberação do alendronato. Para isso, primeiramente foi preparada uma curva de calibração como descrito no tópico 3.5.1. A Figura 28 ilustra o gráfico plotado a partir das concentrações de alendronato utilizadas bem como os valores de absorvância obtidos.

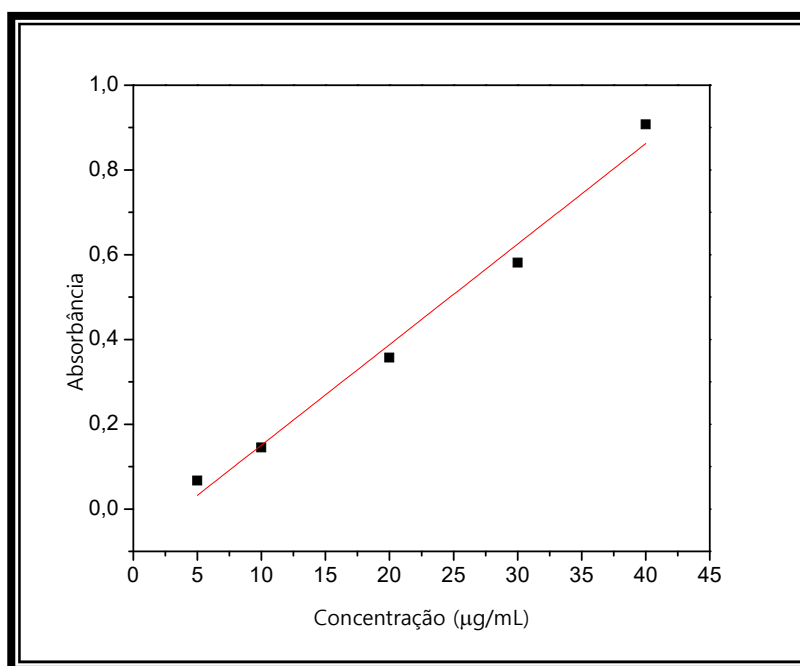


Figura 28 - Curva de calibração do alendronato.
Fonte: Autor.

O gráfico foi ajustado com uma equação linear (programa Origin) e o R^2 obtido foi de 0,9823 com equação de reta $y=0,0237x-0,0217$. Com a curva de calibração preparada, esta foi utilizada para calcular a concentração de alendronato liberada nas amostras.

As curvas de liberação cumulativa das amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2 estão ilustradas na Figura 29.

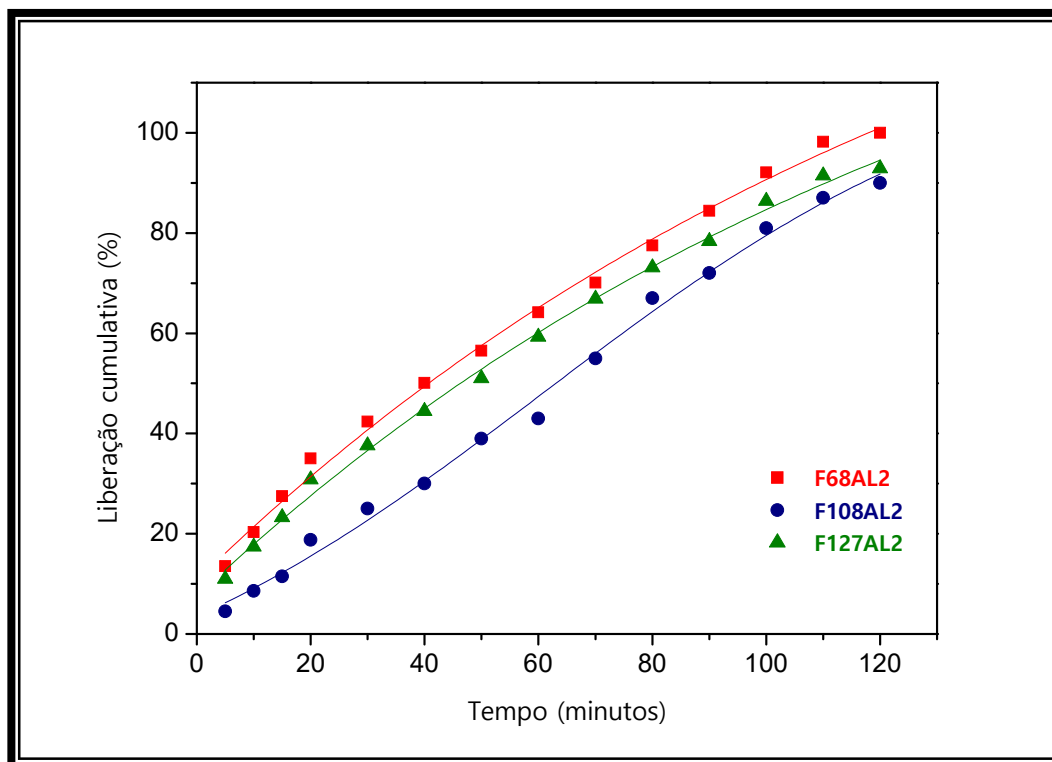


Figura 29 - Curvas de liberação das amostras F68AL2, F108AL2 e F127AL2.
Fonte: Autor.

Observa-se que em todas as amostras alcançou-se mais de 90% de liberação do alendronato em menos de 120min. Apesar das curvas serem relativamente parecidas, podemos dizer que a amostra F68AL2 apresentou a liberação mais rápida entre as três amostras, liberando quase 100% em 120 minutos, em contrapartida a amostra F108AL2 apresentou a liberação mais lenta liberando 90% até os 120 minutos. Considerando apenas a massa molar dos polímeros o resultado faz sentido, pois os polímeros F68, F108 e F127 apresentam massas molares de 8400, 14600 e 12600 respectivamente, e nesse sentido era esperado que a amostra com o polímero de maior massa molar no caso F108 apresentasse uma liberação mais lenta. Mas podemos observar também em relação à característica hidrofílica/hidrofóbica desses polímeros, temos que o número de unidades de PEO que dá o caráter hidrofílico para os polímeros F68, F108 e F127 é respectivamente 157,2; 265,5 e 200,5. O alendronato é um fármaco hidrofílico e espera-se que ele interaja com a parte hidrofílica do copolímero, quanto mais unidades de PEO mais tempo o fármaco fica retido na matriz polimérica, assim a ordem de liberação seria $F68 < F127 < F108$, exatamente o resultado que foi obtido. O comportamento mais interessante foi apresentado pela amostra que continha o polímero F108, por isso

este foi escolhido para a preparação do biocompósito hidroxiapatita-*Pluronic*[®]-alendronato.

A partir dos resultados de liberação foi aplicado o modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (Equação 7).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^\eta \quad (7)$$

Onde M_t/M_∞ representa a fração de fármaco liberada no tempo t , K é a constante de difusão do processo e η é o expoente difusional. O valor de η especifica o mecanismo de liberação (123).

O gráfico plotado $\log (M_t/M_\infty) \times \log (t)$ (linearização através do logaritmo) para todas as amostras, está ilustrado na Figura 30. Um ajuste linear foi realizado até aproximadamente 60% da curva em todas elas. O expoente difusional η foi obtido pelo coeficiente angular da curva e o $\log K$ pelo coeficiente linear.

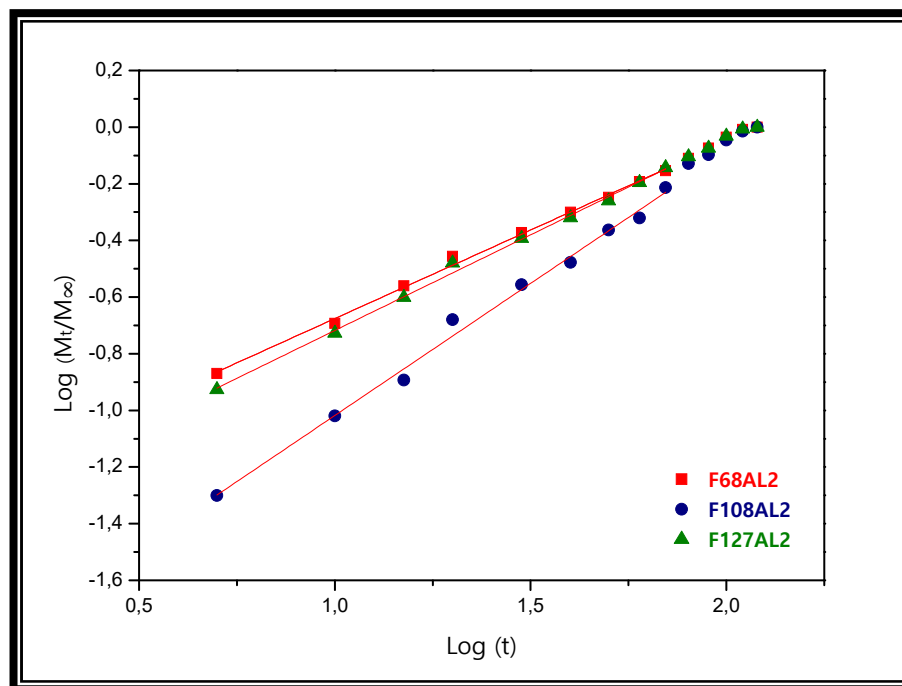


Figura 30 - Curvas da fração de fármaco liberado (M_t/M_∞) em função do tempo das amostras F68AL2, F108AL2, F127AL.

Fonte: Autor.

Os valores obtidos de R^2 e η para cada amostra estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores obtidos a partir do ajuste linear do gráfico $\log (M_t/M_\infty) \times \log (t)$.

Amostras	R ²	η	K
F68AL2	0,99	0,62± 0,01	0,11± 0,02
F108AL2	0,99	0,93± 0,03	0,30± 0,04
F127AL2	0,99	0,67± 0,01	0,14± 0,02

Fonte: Autor.

De acordo com Ritger e Peppas (123), para amostras com valor de η entre 0,5 e 1,0 o mecanismo de liberação principal é o transporte anômalo. Isto significa que para todas as amostras, o processo de liberação é uma combinação da difusão Fickiana do fármaco com a relaxação das cadeias poliméricas da matriz. No transporte anômalo, a velocidade desses dois processos tem a mesma ordem de magnitude.

4.2 Obtenção e caracterização do compósito hidroxiapatita porosa - alendronato

4.2.1 Introdução

Nessa segunda etapa do trabalho, foram preparados compósitos de hidroxiapatita porosa com alendronato. O objetivo foi observar qual seria a diferença de interação do fármaco com o material poroso e como os poros influenciariam em sua liberação.

Para a preparação das amostras foi explorada a afinidade da hidroxiapatita com o alendronato. De acordo com a literatura, ocorrem interações intermoleculares entre a HA e o alendronato. As interações intermoleculares mais importantes ocorrem entre os grupos fosfato e amina do bisfosfonato e o íon cálcio da hidroxiapatita. Os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos com o átomo de nitrogênio do grupo amina compartilham uma carga parcial negativa relativamente grande enquanto os átomos de cálcio são positivamente carregados. Dessa maneira espera-se que as interações moleculares dominantes sejam de natureza eletrostática. A força dessas interações é dependente da distância em que as cargas interagem, diminuindo com o inverso do quadrado da distância (151).

Estudos indicam que na superfície da hidroxiapatita, seis átomos de cálcio são necessários para cercar um grupo hidroxila do bisfosfonato. Existem três átomos de cálcio em um plano e os outros três em um plano adjacente (151).

No alendronato a presença do grupo amina na extremidade da cadeia lateral é muito importante. Além de assegurar a atividade farmacológica *in situ*, o nitrogênio do grupo amina forma uma ligação de hidrogênio OH---N. Esta é uma ligação intermolecular responsável pela conformação mais estável da molécula. Quando o nitrogênio passa a interagir com os íons cálcio da hidroxiapatita, as ligações de hidrogênio são desfeitas. Isto é o que chamamos de quimisorção dos bisfosfonatos para o mineral ósseo (151,152).

Sendo assim, primeiramente foram sintetizadas as hidroxiapatitas porosas que seriam utilizadas para a preparação do biocompósito HA-AL e do biocompósito final HA-*Pluronic*®-AL.

4.2.2 Obtenção e caracterização das hidroxiapatitas porosas

4.2.2.1 Síntese e caracterização das esferas de sílica e molde de esferas de sílica

Utilizando o método de Stöber (75) é sabido da possibilidade de se controlar o tamanho e a distribuição de diâmetros das esferas de sílica, apenas alterando parâmetros de síntese. Sendo assim, torna-se possível modificar certos parâmetros e obter esferas de tamanhos específicos, por exemplo, a taxa de crescimento das partículas é lenta em baixas concentrações de amônia, em baixas concentrações de água, ou em temperaturas baixas. Vale destacar a versatilidade do método de se utilizar esferas de sílica como molde de sacrifício visto a possibilidade de obter materiais com poros de tamanhos desde a ordem de poucos nanômetros até a de micrometros dependendo da aplicação desejada.

As micrografias e os histogramas das amostras S400 e S200 estão representados pelas Figuras 31 e 32, respectivamente. Os histogramas foram preparados por meio da contagem de 200 esferas (Image J) nas micrografias obtidas, e o diâmetro médio foi obtido estatisticamente. O histograma da amostra S400 foi ajustado com uma função Log-normal ($R^2 = 0,98$). O diâmetro médio obtido foi de 402 ± 35 nm. Para a amostra S200, o histograma também foi ajustado com uma função Log-normal ($R^2 = 0,88$). O diâmetro médio obtido foi de 223 ± 22 nm. Observam-se nas duas amostras esferas bem definidas e com poucas deformações, estas últimas são comuns em esferas menores na ordem de dezenas de nanômetros.

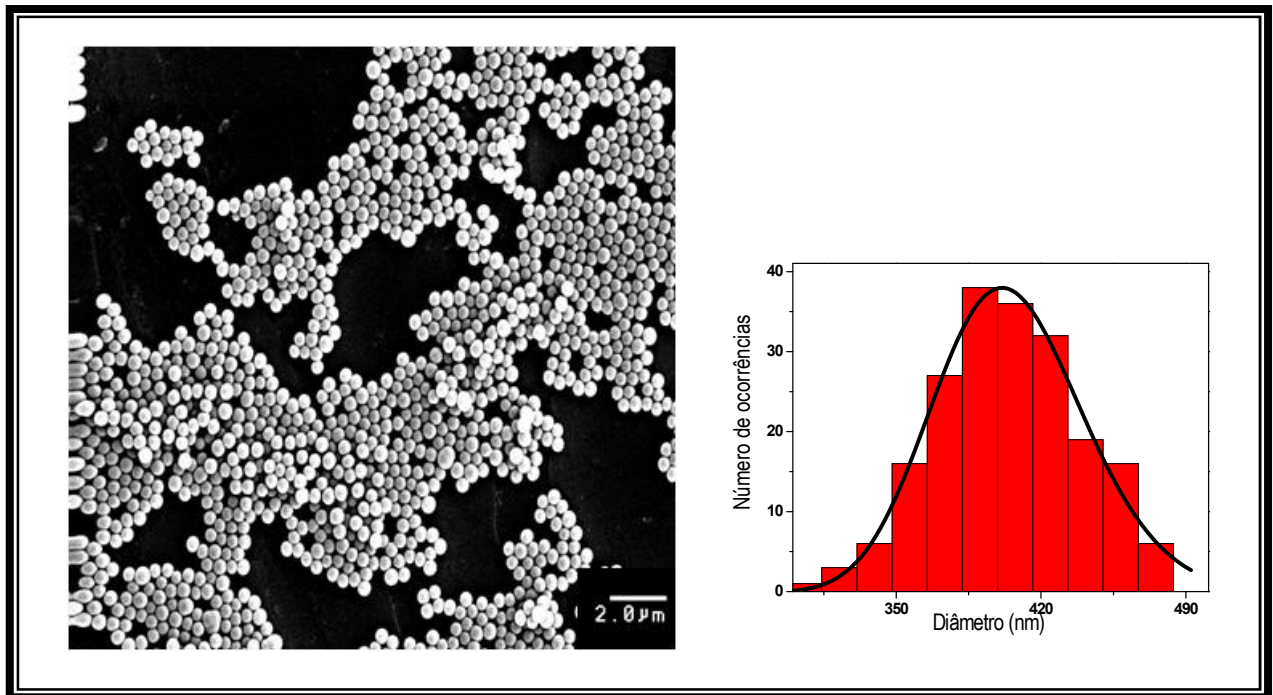


Figura 31 - Micrografias eletrônicas de varredura e histograma da amostra S400.
Fonte: Autor.

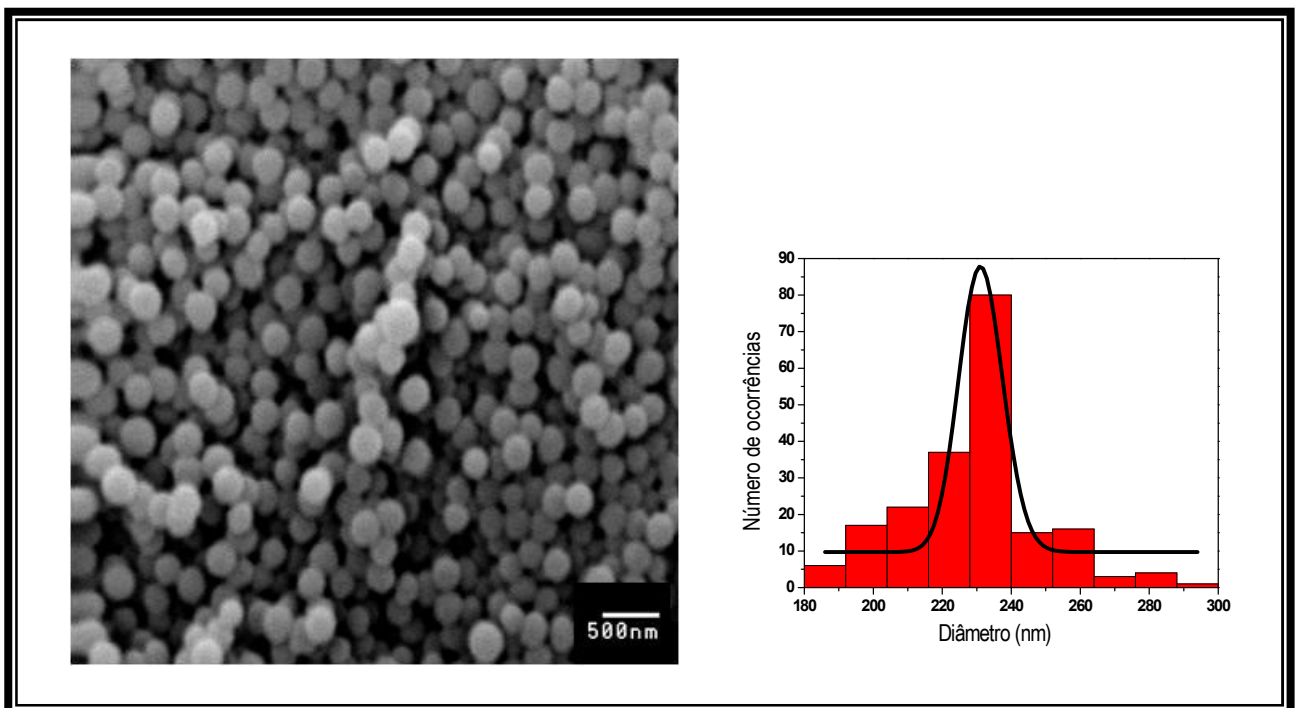


Figura 32 - Micrografias eletrônicas de varredura e histograma da amostra S200.
Fonte: Autor.

O diâmetro médio das amostras S400 e S200 também foi medido por meio do espalhamento de luz dinâmico. A análise foi realizada em triplicata e foi tirada a média aritmética dos valores obtidos. Assim os valores dos diâmetros médios encontrados foram de $479\pm 55\text{nm}$ com um índice de polidispersividade de 41% para a amostra S400 e $238\pm 30\text{nm}$ com um índice de polidispersividade de 20%. Apesar de próximos, nas duas amostras os diâmetros médios do DLS estão com valores um pouco maiores do que os encontrados nas micrografias. A diferença de tamanho pode ser explicada devido a natureza da medida do DLS. No DLS o que se mede é o diâmetro hidrodinâmico da partícula, ou seja, a partícula e toda a nuvem de moléculas de água (esfera de hidratação) que se movimenta com ela, gerando assim diâmetros médios maiores que nas análises de microscopia, onde, além de tudo, se observam as partículas previamente secas.

As esferas de sílica também foram caracterizadas por análise de difração de raios X. O difratograma da amostra representativa S400 está ilustrado na Figura 33. Analisando o difratograma, observa-se um halo na região de 15° a 35° 2θ , que está relacionada ao estado amorfo da sílica (153). Este resultado era esperado, pois é sabido que a sílica é um material amorfo mesmo após calcinação a 1100°C . Apenas após calcinação a 1300°C tem-se a formação da fase α -cristobalita (154).

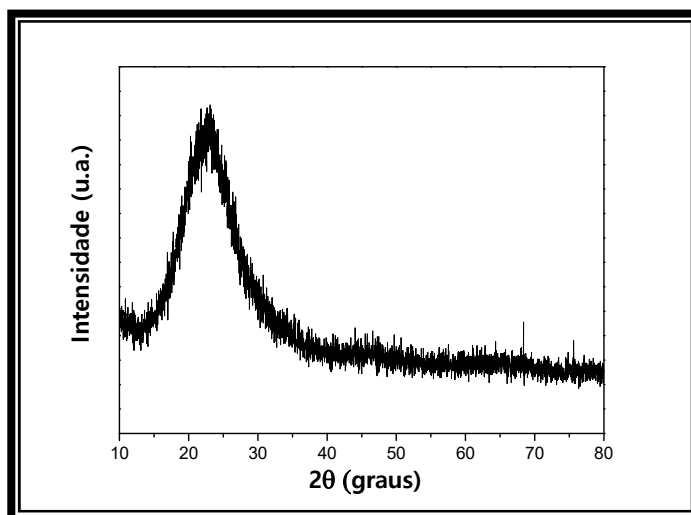


Figura 33 - Difratograma de raios X da amostra S400.

Fonte: Autor.

Seguindo o experimental descrito anteriormente, a partir da amostra de esferas de sílica, foram preparados os moldes por sedimentação gravitacional. A

Figura 34 ilustra as micrografias eletrônicas de varredura (a) do molde preparado com amostra S400 nomeado de TP400 e (b) do molde preparado com a amostra S200, nomeado TP200. Observa-se que as esferas se organizaram formando um empacotamento compacto como era esperado, diferente das micrografias das duas amostras onde não se observava nenhum tipo de organização das partículas, nota-se também a tendência das esferas de se organizarem em hexágonos a pequenas distâncias. A longa distância, essa organização vai se perdendo.

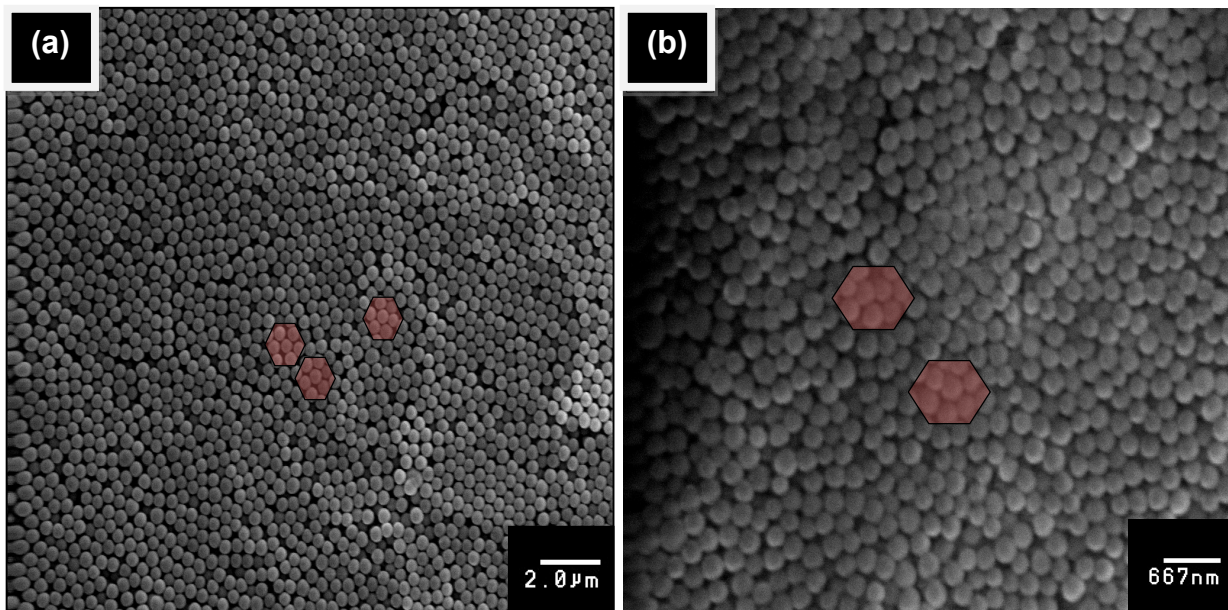


Figura 34 - Micrografias eletrônicas de varredura da amostra (a) TP400 e (b) TP200.
Fonte: Autor.

4.2.2.2 Caracterização das HA porosas

O precursor de HA e o molde de sílica foram utilizados para sintetizar a HA porosa, como foi detalhado anteriormente na parte experimental. Após a remoção da sílica, foi realizada microscopia eletrônica de varredura no material obtido. A Figura 35 ilustra as micrografias eletrônicas de varredura das amostras (a) HA400 e (b) HA200, obtida através do molde TP200 e TP400. Observam-se poros ordenados, com médias de tamanhos na ordem de 350nm e 170nm respectivamente para as amostras HA400 e HA200 e sem nenhum resquício das esferas de sílica. Era esperado que o diâmetro dos poros fosse menor que o das esferas no molde, visto que é realizado um tratamento térmico a 500°C no molde de esferas de sílica. Essa calcinação faz com que a água adsorvida na superfície da sílica seja liberada e haja

a condensação dos grupos silanóis presentes na superfície em grupos siloxanos, o que leva a uma maior aproximação (adesão) das esferas. Como os poros são o negativo das esferas estes acabam com diâmetros um pouco menores. Observou-se também que após a sinterização houve o aumento na resistência mecânica do molde.

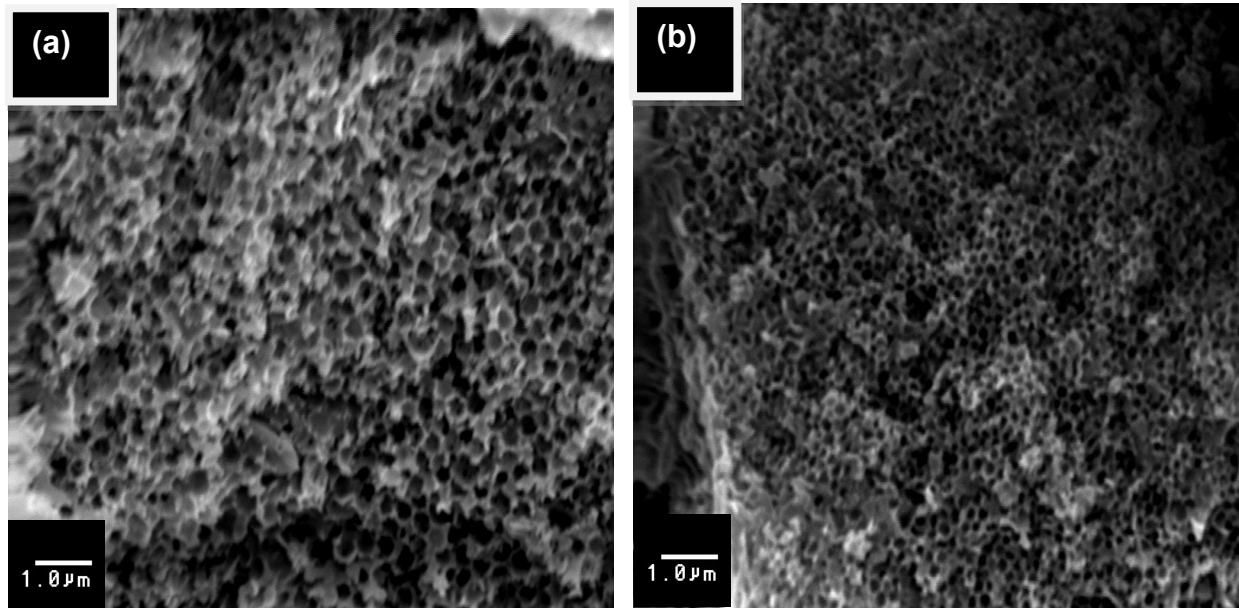


Figura 35 - Micrografias eletrônicas de varredura das amostras (a) HA400 e (b) HA200.
Fonte: Autor.

A amostra de hidroxiapatita porosa também passou por análise de difratometria de raios X. A Figura 36 ilustra a comparação do difratograma da amostra HA400 antes da remoção das esferas de sílica, e após a remoção quando houve a formação da hidroxiapatita porosa de fato, além do difratograma da amostra de HA em pó (HAP) e do padrão de HA JCPDS-74-565.

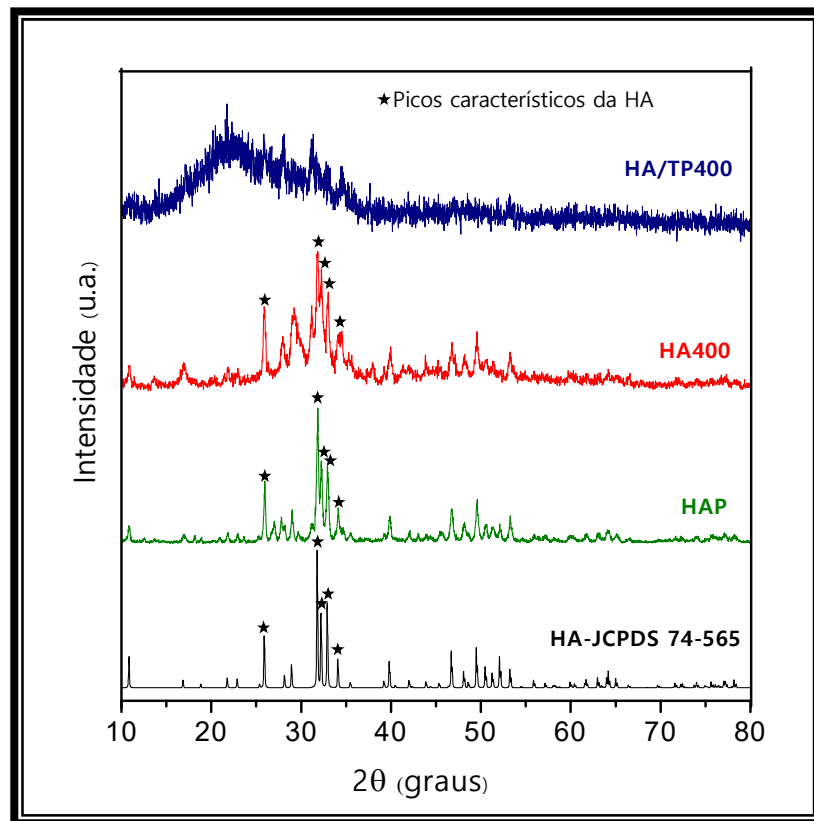


Figura 36 - Difratoograma de raios X da amostra HA400 antes da remoção e depois da remoção das esferas de sílica, da amostra HAP e o padrão de difração de raios X da fase HA.

Fonte: Autor.

Na amostra ainda com as esferas o alo amorfo da sílica está encobrendo os picos da fase hidroxiapatita impossibilitando suas atribuições. Após a remoção das esferas com hidróxido de sódio (NaOH 5M) o difratograma da amostra não apresenta mais o alo amorfo e todos os principais picos característicos da fase HA correspondentes aos planos (0 0 2), (2 1 1), (1 1 2), (3 0 0), e (2 0 2) (142,155) foram encontrados. A Tabela 14 apresenta os valores das distâncias interplanares para a amostra. O resultado indica uma total remoção das esferas de sílica e que não houve nenhuma modificação do material durante a preparação da hidroxiapatita porosa. Em relação aos picos mais alargados do difratograma em relação ao pó de hidroxiapatita, não foi possível atribuir algum motivo, substituições da rede podem alargar os picos bem como diminuição da cristalinidade.

Tabela 14 - Atribuição dos principais picos observados no difratograma de raios X da amostra HA400.

Amostra HA400		HA padrão JCPDS-74-565		
2 θ (graus)	d (Å)	2 θ (graus)	d (Å)	hkl
25,93	3,431	25,93	3,439	002
31,84	2,799	31,82	2,815	211
32,28	2,773	32,20	2,778	112
32,96	2,713	32,96	2,720	300
34,12	2,625	34,11	2,629	202

Fonte: Autor.

4.2.3 Caracterização do compósito hidroxiapatita-alendronato

As amostras do compósito hidroxiapatita-alendronato foram preparadas como descrito previamente. Foram usados três tipos de hidroxiapatita, as porosas HA200 (poros na ordem de 200nm) e HA400 (poros na ordem de 400nm) e a hidroxiapatita em pó com tamanho de cristalito na ordem de 100nm. As amostras foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho e calorimetria exploratória diferencial.

4.2.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho

A Figura 37 ilustra os espectros vibracionais na região do infravermelho do alendronato, das hidroxiapatitas HA400, HA200 e HAP e para as amostras HA400AL, HA200AL e HAPAL. No fármaco foi possível atribuir bandas pertencentes aos grupos fosfato, sendo a deformação angular da ligação O–P–O em 476, 527 e 570 cm^{-1} e a deformação axial da ligação P–O em 846, 918, 952, 1020 e 1046 cm^{-1} (142,143). Bandas pertencentes a amina primária NH_2 , em 1605 e 1642 cm^{-1} referentes a deformação angular da ligação N-H e em 3486 cm^{-1} (131,144) referente à deformação axial da ligação N-H, e por último foram atribuídas bandas pertencentes a as cadeias carbônicas em 1408,1451 e 1470 cm^{-1} referentes a deformação angular da ligação C-H. As bandas em 1133,1174 e 1233 cm^{-1} podem ser referentes a deformação axial da ligação C-N, a deformação axial da ligação C-P e a deformação angular da ligação H-O-P(145).

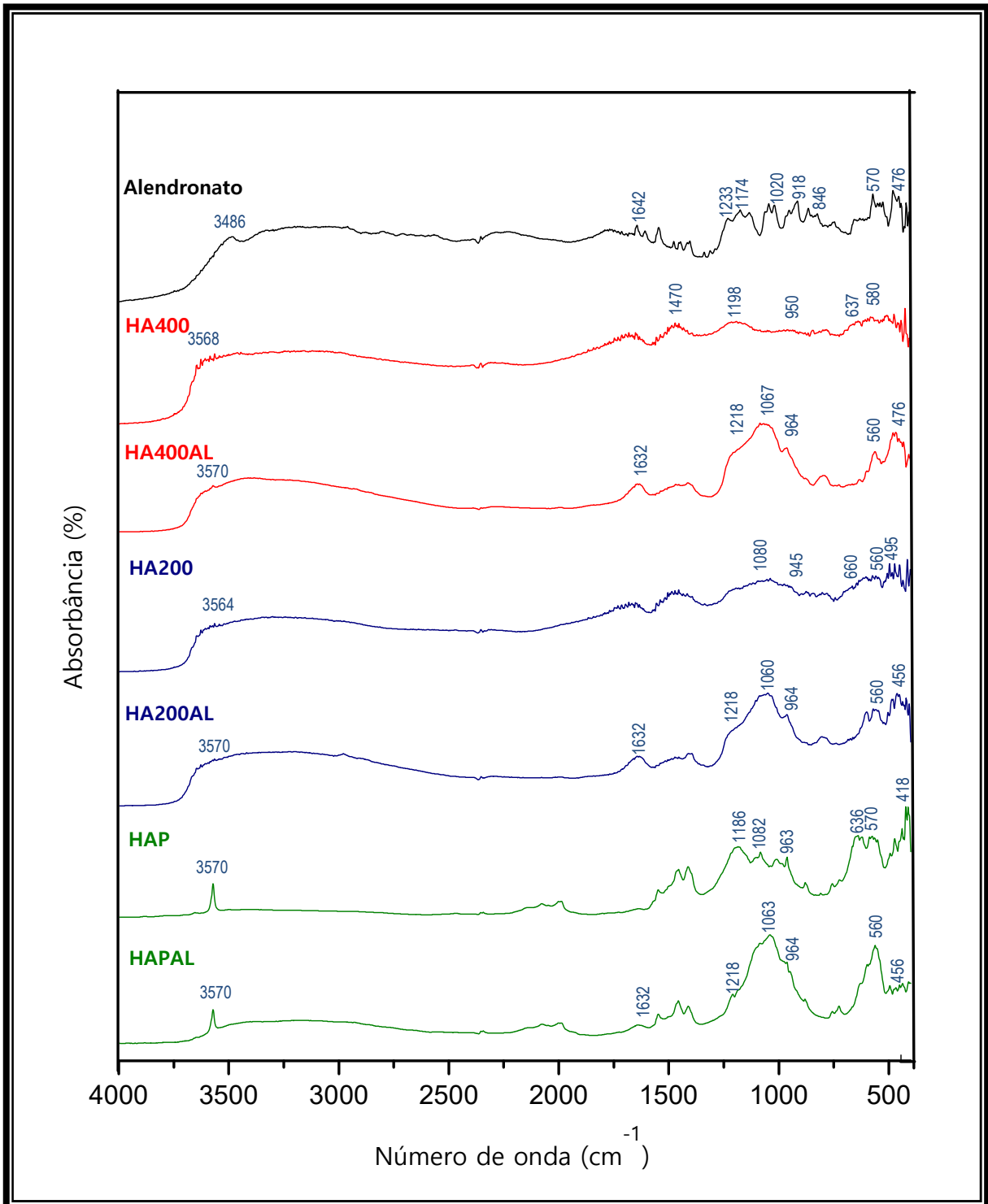


Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras alendronato, HA400, HA400AL, HA200, HA200AL, HAP e HAPAL.

Fonte: Autor.

Para as amostras de hidroxiapatita, foram atribuídas bandas referentes aos grupos fosfato, primeiramente da deformação angular da ligação O-P-O, em 475, 512 e 580 cm⁻¹ para amostra HA400, 495, 560 e 596 cm⁻¹ para a amostra HA200, e

em 418 e 570 cm^{-1} para a amostra HAP. Segundo, para a deformação axial da ligação P-O em 950 e 1198 cm^{-1} para a amostra HA400, 946 e 1080 para a amostra HA200 e 963, 1082 e 1186 cm^{-1} para a amostra HAP. Na região entre 1400 e 1500, foi atribuída uma banda referente aos grupos carbonatos que se encontram adsorvidos na amostra devido à exposição ao ar durante a síntese, essa banda se encontra em 1470, 1462 e 1453 cm^{-1} para as amostras HA400, HA200 e HAP respectivamente. Por último, na região de 3500 a 3600, uma banda referente à deformação angular do OH estrutural da hidroxiapatita (156) em 3568, 3564 e 3570 cm^{-1} para as amostras HA400, HA200 e HAP respectivamente. Destaca-se que essa banda na amostra HAP é mais intensa e mais fina comparada as bandas das amostras porosas, essa banda está relacionada com a cristalinidade da HA (142).

Para as amostras de hidroxiapatita com alendronato era esperado observar em seus espectros bandas referentes aos dois materiais. Na amostra HA400AL, as bandas em 476 e 560 cm^{-1} foram atribuídas à deformação angular da ligação O-P-O e em 946 e 1067 cm^{-1} a deformação axial da ligação P-O todas pertencentes ao grupo fosfato. A banda em 1218 cm^{-1} pode ter diferentes atribuições, a deformação angular da ligação H-O-P e a deformação axial da ligação C-N. Em 1632 cm^{-1} a banda pode ser atribuída à deformação angular da ligação N-H e por último a banda em 3570 cm^{-1} ao OH estrutural da HA. Para as amostras HA200AL e HAPAL, os espectros obtidos e a atribuição das suas bandas foram semelhantes ao da amostra HA400AL. Na amostra HA200AL foram observadas bandas em 421, 456, 560 e 580 cm^{-1} referentes a ligação O-P-O, em 964 e 1060 cm^{-1} a ligação P-O, em 1218 cm^{-1} referente a ligação C-N e a ligação H-O-P, em 1632 cm^{-1} referente a ligação N-H e em 3564 cm^{-1} ao OH da HA. Para a amostra HAPAL foram observadas bandas em 437, 456, 495 e 560 cm^{-1} (O-P-O), em 964 e 1063 cm^{-1} (P-O), em 1218 cm^{-1} (C-N e H-O-P), em 1632 cm^{-1} (N-H) e em 3572 cm^{-1} (OH).

Em todas as amostras na região entre 800 e 1300 cm^{-1} , é possível observar uma banda larga e intensa, com um perfil diferente do observado para os materiais separados. Nessa região encontram-se bandas pertencentes tanto ao alendronato como a hidroxiapatita, acredita-se que a sobreposição das bandas dos dois materiais deu origem a essa banda mais larga. Apesar do resultado indicar que houve a incorporação do alendronato na HA, não foi possível observar se houve deslocamento das bandas dos grupos fosfatos. Entretanto a interação intermolecular

entre o AL e a HA ocorre também pelo grupamento amina, sendo assim observa-se que em todas as amostras as bandas referentes a deformação angular da ligação N-H se encontram deslocadas em 10cm^{-1} em relação ao alendronato, para o fármaco a banda foi encontrada em 1642 cm^{-1} e para todas as amostras em 1632 cm^{-1} . O deslocamento das bandas no infravermelho indicam que os íons presente na ligação estão sofrendo uma influência diferente do que acontecia anteriormente. Ou seja, esse deslocamento pode indicar a formação da interação esperada entre amina e os íons Ca^+ (151).

4.2.3.2 *Calorimetria exploratória diferencial*

Dando sequência as caracterizações, todas as amostras foram analisadas por calorimetria diferencial exploratória. A Figura 38 ilustra os termogramas do alendronato, e das amostras HA400, HA200, HAP, HA400AL, HA200AL e HAPAL. Como já descrito anteriormente o alendronato apresenta três eventos. Um endotérmico em 131°C referente à perda de água de hidratação, o segundo evento endotérmico em 268°C corresponde ao ponto de fusão do fármaco e o último evento exotérmico em 274°C a decomposição da amostra. A amostra HA400 possui dois eventos endotérmicos sobrepostos um em 128°C e o outro em 144°C . Apesar da amostra HA400 ter passado por um tratamento térmico prévio para a formação da fase HA, depois disso ela foi submetida a vários processos incluindo uma etapa de lavagem, por isso esses eventos podem ser referente à perda de água adsorvida na apatita (157). Da mesma maneira a amostra HA400AL também possui apenas um evento térmico, um pico largo endotérmico que começa em 47°C e vai até 267°C com o máximo em 138°C , e que também pode ser atribuída a perda de água. A origem desse evento não é clara, sendo assim a perda de água pode estar relacionada apenas com o fármaco, com a hidroxiapatita ou mesmo com a própria amostra, da mesma maneira que pode ser uma combinação desses eventos. A amostra HA200 da mesma maneira que a amostra HA400, possui dois eventos sobrepostos um em 114°C e outro em 137°C referente à perda de água adsorvida, observa-se também um evento endotérmico a 174°C . Para a amostra HA200AL, observa-se um pico largo que começa em 54°C e termina em 243°C com o seu máximo em 132°C , também referente à perda de água. A amostra HAP possui um evento térmico endotérmico, um pico alargado que começa em 10°C e termina em

60°C. Não foi possível a atribuição do evento, pois a medida de DSC foi realizada após a amostra sofrer um tratamento térmico a 700°C, o que eliminaria qualquer presença de componentes voláteis e moléculas de água. Já a amostra HAPAL apresenta um evento térmico endotérmico principal, um pico largo que começa em 35°C e termina em 188°C com o seu máximo em 82°C que pode ser atribuído a perda de água.

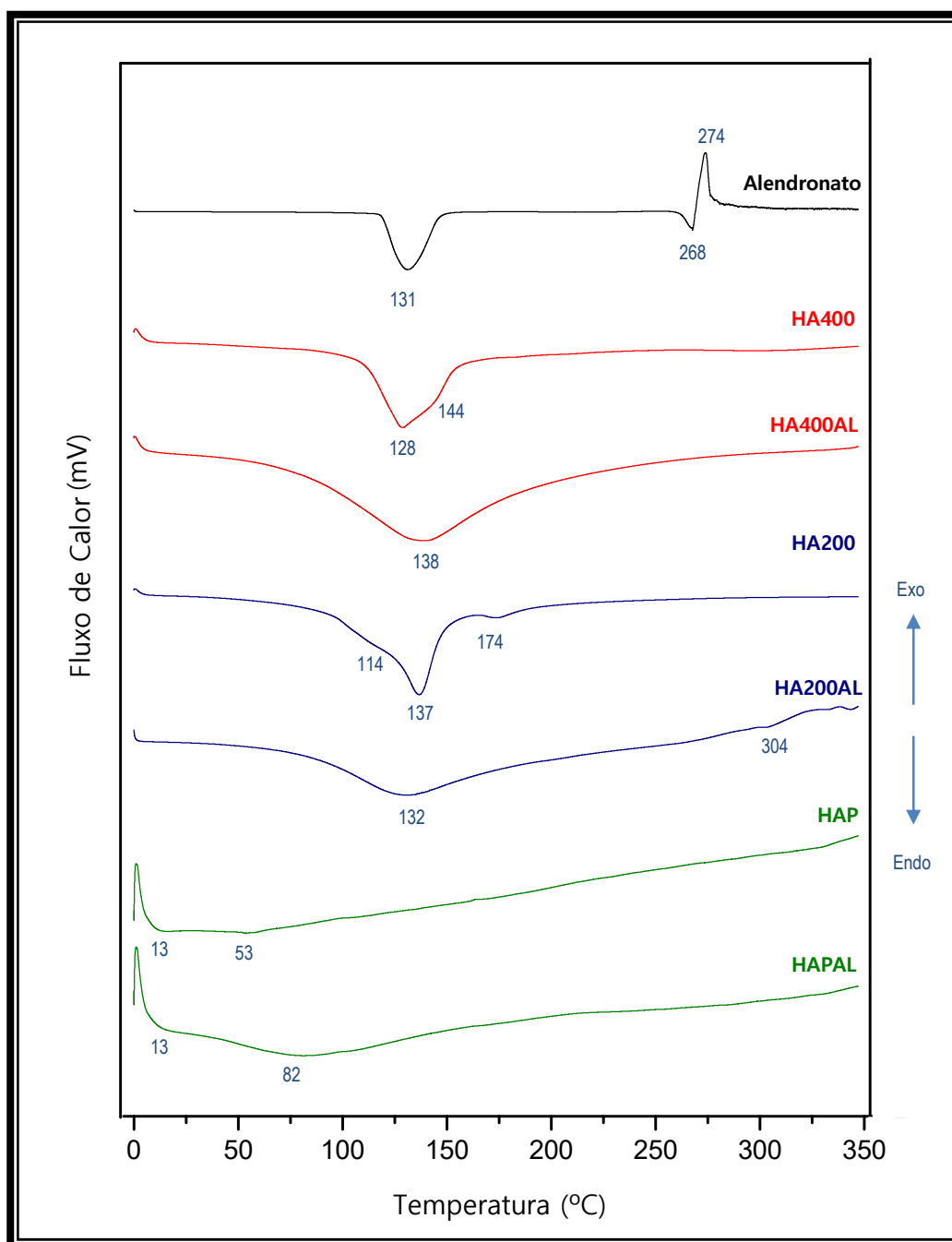


Figura 38 - Curvas de DSC das amostras alendronato, HA400, HA400AL, HA200 e H200AL HAP e HAPAL.

Fonte: Autor.

A Tabela 15 resume os eventos térmicos suas atribuições.

Tabela 15 - Atribuição dos eventos térmicos para as diferentes amostras de HA porosa-AL.

Amostras	Evento 1			Evento 2			Evento 3		
	Tipo	T(°C)	Atribuição	Tipo	T(°C)	Atribuição	Tipo	T(°C)	Atribuição
HA400	Endo	128	Perda de água	Endo	144	Perda de água	-	-	-
HA200	Endo	114	Perda de água	Endo	137	Perda de água	Endo	174	-
HAP	Endo	13		Endo	53	-	-	-	-
AL	Endo	131	Perda de água de hidratação	Endo	268	Fusão	Exo	274	Decomposição
HA400AL	Endo	138	Perda de água	-	-	-	-	-	-
HA200AL	Endo	132	Perda de água	Endo	304	-	-	-	-
HAPAL	Endo	82	Perda de água	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autor.

A partir dos resultados obtidos na análise de DSC foi possível observar que as amostras HA400AL, HA200AL e HAPAL possuem um evento térmico principal relacionado à perda de água. No geral não é possível atribuir à origem dessa água, nas amostras HA400AL e HA200AL os eventos se encontram deslocados para maiores temperaturas em relação ao evento do alendronato, e também se encontram deslocados em relação à hidroxiapatita. Já para a amostra HAPAL, o único evento térmico da amostra está em uma temperatura muito abaixo ao evento do fármaco, e a hidroxiapatita não apresenta um evento relacionado à perda de água. Esses resultados, juntamente com o que foi observado na espectroscopia no infravermelho, onde as bandas referentes a ligação N-H da amina terminal presente no alendronato estão deslocadas exatamente a 10cm^{-1} em todas as amostras podem indicar que o alendronato está realmente interagindo com a hidroxiapatita nas amostras.

4.2.3.3 Curvas e cinética de liberação do alendronato

Antes de realizar a curva de liberação para as amostras do compósito hidroxiapatita-alendronato, foi medida a quantidade de fármaco incorporada nas amostras. Depois de realizada a incorporação, o sobrenadante foi retirado e foi realizado o teste da ninidrina, a quantidade incorporada foi calculada pela quantidade inicial de fármaco na solução menos a quantidade de fármaco obtida no

sobrenadante das amostras ao final da incorporação (tópico 3.5.2. Os resultados obtidos estão na Tabela 16.

Tabela 16 - Quantidade de alendronato incorporada nas amostras.

Amostra	Quantidade incorporada (mg)	Quantidade incorporada (%)
HA400AL	8,56	85,6
HA200AL	8,26	82,6
HAPAL	6,01	60,1

Fonte: Autor.

Observa-se que para as amostras porosas foram incorporados mais de 80% do fármaco e para a amostra HAPAL foi incorporado 60% do alendronato, o que no geral é um ótimo resultado. A maior incorporação do fármaco nas amostras porosas é devido a sua maior área de superfície, obtida por meio da presença dos poros. Quanto mais área de superfície mais sítios de interação com o fármaco são possíveis.

As curvas de liberação das amostras HA-AL estão ilustradas na Figura 39. Observa-se que depois de 72h para nenhuma das amostras a liberação passou de 35%. A amostra HAPAL apresentou a maior liberação, exatamente com 35% em 72h. As duas amostras porosas apresentaram liberação menor que 25%, a amostra HA400AL liberou um máximo de 24% em 72h, enquanto a amostras HA200AL liberou um máximo de 20%. Os resultados indicam que a presença dos poros levou a uma liberação mais lenta do alendronato. Acredita-se que os poros criam um impedimento e dificultam a difusão do fármaco para o meio. Entre as amostras porosas, a amostra com poros maiores apresentou uma maior liberação do que a com poros menores, resultado que era esperado, pois o diâmetro do poro tem uma forte influência na taxa de liberação.

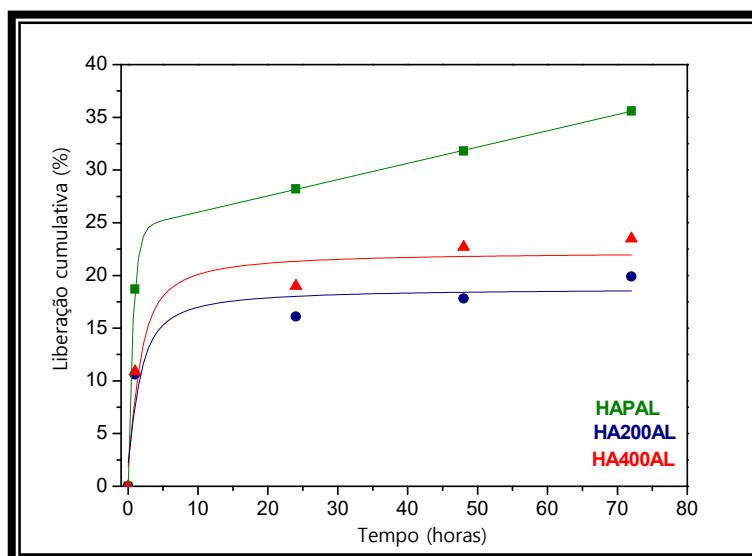


Figura 39 - Curvas de liberação das amostras HA400AL, HA200AL e HAPAL.
Fonte: Autor.

A partir dos resultados de liberação foi aplicado o modelo cinético de Higuchi (Equação 8)

$$Q_t = K_h \sqrt{t} \quad (8)$$

Onde Q_t é a quantidade da substância liberada no tempo t e K_h é a constante de liberação para o modelo de Higuchi. Esse modelo é aplicado para matrizes pouco solúveis, em que o processo de liberação é governado pela difusão. Normalmente também é aplicado para materiais mesoporosos, como sílicas e fosfatos de cálcio(119).

O gráfico plotado $Q_t \times t^{1/2}$ para todas as amostras, está ilustrado na Figura 40.

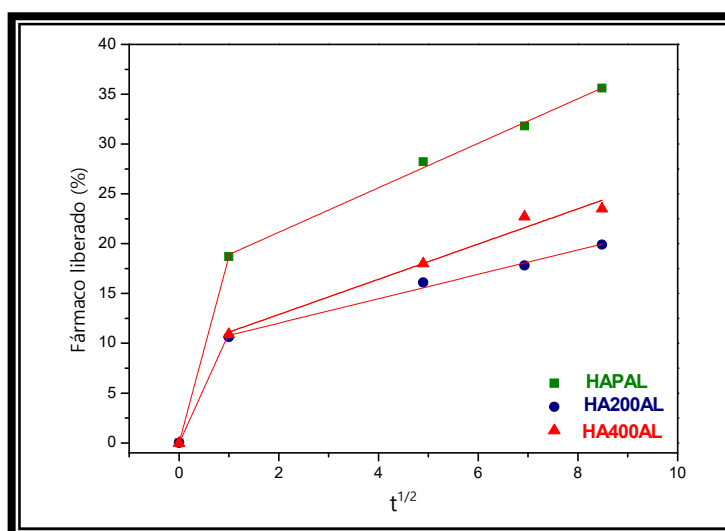


Figura 40 – Curvas da quantidade de fármaco liberado (Q_t) em função da raiz quadrada do tempo das amostras HAPAL, HA200 e HA400.
Fonte: Autor.

Os coeficientes de correlação obtidos para as curvas foram 0,99; 0,99 e 0,97 para as amostras HAPAL, HA200AL e HA400AL respectivamente, pode-se dizer então que a cinética de liberação do alendronato seguiu o modelo de Higuchi. Observa-se que para as três amostras, o perfil obtido apresentou duas etapas, uma referente a uma liberação inicial rápida, seguida por uma liberação mais lenta. A maioria dos trabalhos envolvendo cinética de liberação de fármacos em materiais mesoporosos é freqüentemente descrita usando o modelo de Higuchi (119) com um perfil de liberação em duas etapas.

4.3 Obtenção e caracterização do compósito hidroxiapatita porosa - Pluronic® - alendronato

4.3.1 Introdução

Devido aos resultados obtidos na caracterização das amostras de matriz polimérica e alendronato e também dos resultados obtidos na liberação que serão discutidos posteriormente, foi escolhido o polímero F108 para a preparação do biocompósito com HA e alendronato.

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Em uma primeira etapa as amostras foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho. A Figura 41 ilustra os espectros das amostras F108HA400AL, F108HA200AL e F108HAPAL, juntamente com as amostras HA400, HA200 e HAP além do alendronato e do polímero F108.

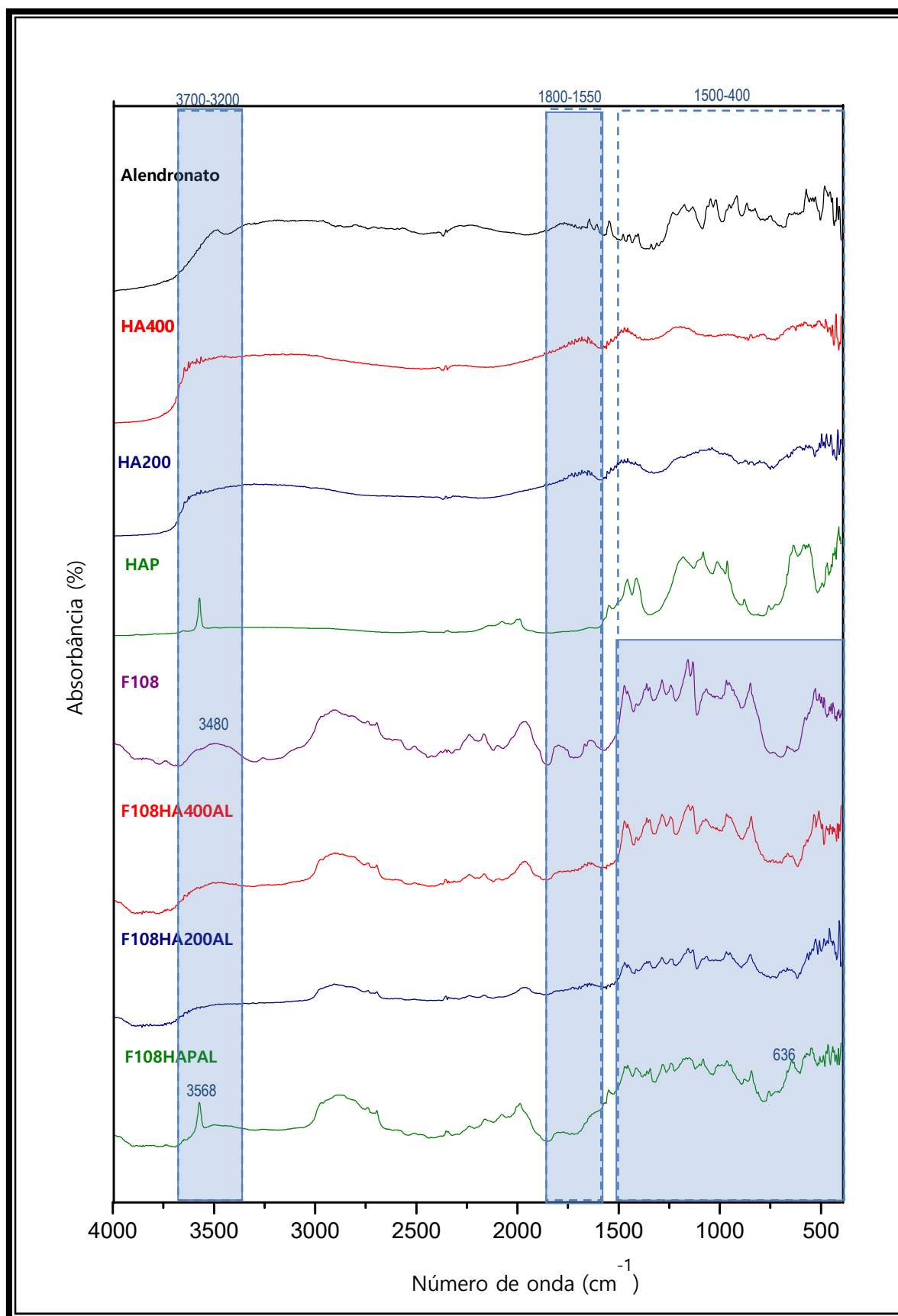


Figura 41 - Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras alendronato, HA400, HA200, HAP, F108 e F108HA400AL, F108HA200AL e F108HAPAL.

Fonte: Autor.

No espectro da amostra F108HA400AL (Figura 41) observa-se que apesar de ser a junção de três materiais diferentes, as bandas referentes ao polímero F108 encobrem quase todas as bandas referentes ao fármaco e a hidroxiapatita. As bandas provenientes dos grupos fosfato presentes tanto na hidroxiapatita quanto no alendronato que podem ser encontradas na faixa de 400 a 1200 cm^{-1} estão encobertas por bandas do polímero relativas às cadeias carbônicas (deformações angulares C-H entre 1150 e 1500 cm^{-1} , vibração axial C-C entre 800 e 1200 cm^{-1}), e as vibrações referentes ao grupamento éter (deformação axial C-O-C 1085 e 1150 cm^{-1}) e álcool (deformação axial C-O entre 1000 e 1200 cm^{-1} , deformação angular O-H entre 1420 e 1330 cm^{-1}). Também não é possível confirmar a banda referente a deformação angular da amina em torno de 1600 cm^{-1} , entretanto observa-se um ligeira diferença no espectro do amostra F108HA400AL em relação ao polímero F108 na faixa entre 1565 e 1840 cm^{-1} , que pode ser um indicativo da presença da banda de amina. A banda de deformação axial do O-H referente ao álcool do polímero que estaria na faixa de 3200 a 3550 cm^{-1} , que é bem nítida no polímero em 3480 cm^{-1} , não é observada na amostra, nesta faixa ela apresenta um perfil mais parecido com a hidroxiapatita e o alendronato.

No geral o resultado obtido para a amostra F108HA200AL e para a amostra F108HAPAL foi parecido com o da amostra F108HA400AL. As bandas referentes ao polímero encobriram a maioria das bandas referentes ao fármaco e a hidroxiapatita, também não é possível atribuir à banda da amina, mas nota-se uma mudança na região dessa banda em relação ao polímero. Em nenhuma das amostras foi observada a banda da deformação axial do álcool do polímero. Entretanto para a amostra F108HAPAL é possível observar em 636 e 3568 cm^{-1} bandas referentes à deformação axial e a deformação angular respectivamente do OH estrutural da hidroxiapatita, que também é observada na amostra HAP.

4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para analisar a morfologia dos biocompósitos, foram obtidas micrografias eletrônicas de varredura das diferentes amostras. A Figura 42 ilustra as micrografias obtidas para a amostra F108HA400AL. Na Figura 42(a) é possível observar regiões com muitos poros abertos, e regiões com alguns cristais. Devido à natureza

cristalina tanto do polímero quanto do fármaco, fica difícil uma atribuição. Aproximando a imagem é possível observar na Figura 42(b) uma região em que alguns poros foram encobertos pela modificação com o polímero, observa-se também alguns cristais que são mais parecidos com os cristais do fármaco. Na figura 42(c) é possível observar poros modificados com o polímero.

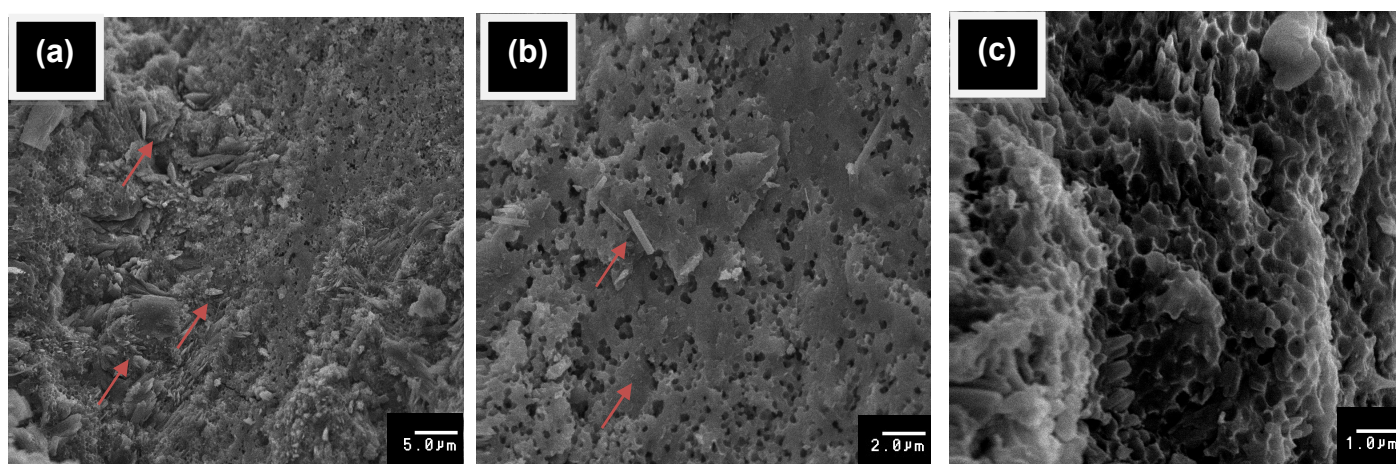


Figura 42 - Micrografias eletrônicas de varredura da amostra F108HA400AL.
Fonte: Autor.

A Figura 43 ilustra as micrografias obtidas para a amostra F108HA200AL. O resultado é parecido com a amostra anterior, observa-se que a modificação com polímero foi eficaz, e que a maioria dos poros permaneceram abertos.

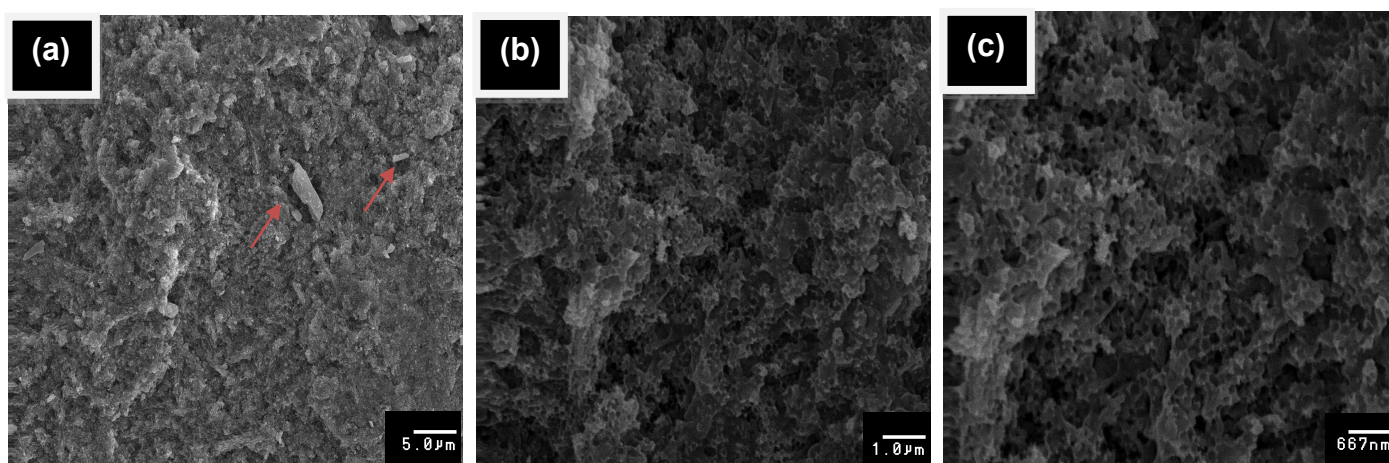


Figura 43 - Micrografias eletrônicas de varredura da amostra F108HA200AL
Fonte: Autor.

A Figura 44 ilustra as micrografias obtidas para a amostra F108HAPAL, não é possível observar os cristais de hidroxiapatita nela, toda amostra parece estar revestida com o polímero.

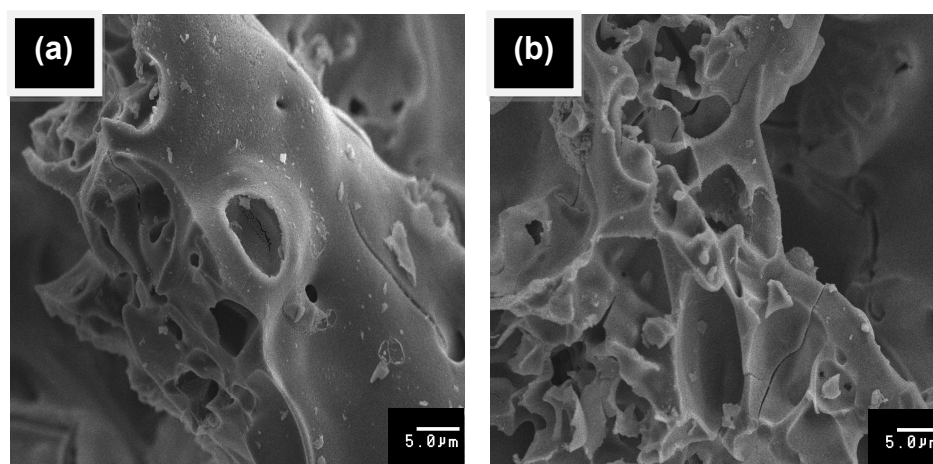


Figura 44 - Micrografias eletrônicas de varredura da amostra F108HAPAL
Fonte: Autor.

4.3.4 Calorimetria diferencial exploratória

Por último os bicompostos foram analisados por calorimetria exploratória diferencial. A Figura 45 ilustra os termogramas das amostras F108HA400AL, F108HA200AL e F108HAPAL, das amostras HA400, HA200 e HAP e do alendronato e polímero F108.

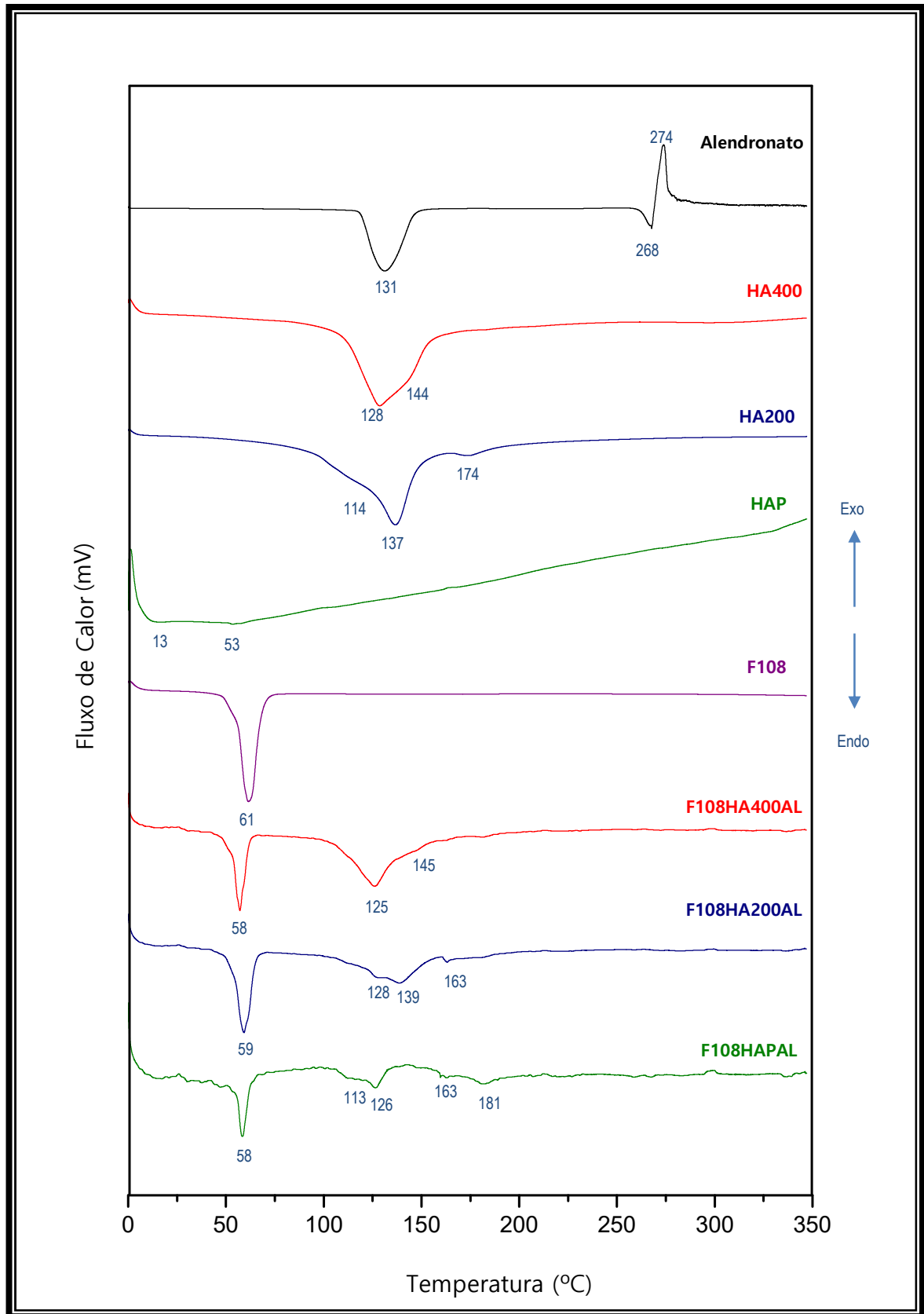


Figura 45 - Curvas de DSC das amostras alendronato, HA400, HA200, HAP, F108, F108HA400AL, F108HA200AL, F108HAPAL.

Fonte: Autor.

Observa-se que a amostra F108HA400AL apresenta três eventos térmicos principais, um primeiro referente à fusão do polímero F108 em 58°C e os outros dois sobrepostos em 125 e 145°C referente à perda de água. A amostra F108HA200AL apresenta quatro eventos térmicos principais, um endotérmico a 59°C referente à fusão do F108, e três endotérmicos a 128°, 133°C e 163°C referente à perda de água (157). Já a amostra F108HAPAL apresenta cinco eventos principais, um endotérmico a 58°C referente à fusão do F108, três endotérmicos a 113°, 126°C e 163°C referente à perda de água e o último endotérmico em 181°C. Os resultados obtidos para todas as amostras indicaram a presença dos três materiais que as compõem. Os eventos relacionados à fusão do copolímero F108 estão deslocados apenas poucos graus para menores temperaturas em relação ao polímero que funde a 61°C, o que indica que a cristalinidade do polímero foi pouco afetada. Já os eventos relacionados à perda de água podem ser relacionados tanto com a hidroxiapatita (perda de água adsorvida) no caso das amostras que foram preparadas com a HA400 e a HA200 quanto ao alendronato (perda de água de hidratação). Na amostra F108HAPAL esse evento só pode ser atribuído ao alendronato visto que a amostra HAP não possui nenhum evento nessa região. A Tabela 17 resume os eventos térmicos das amostras HA porosa-polímero-AL e suas atribuições.

Tabela 17 - Atribuição dos eventos térmicos para as diferentes amostras de HA porosa-polímero-AL.

Amostras	Evento 1			Evento 2			Evento 3		
	Tipo	T(°C)	Atribuição	Tipo	T(°C)	Atribuição	Tipo	T(°C)	Atribuição
HA400	Endo	128	Perda de água	Endo	144	Perda de água	-	-	-
HA200	Endo	114	Perda de água	Endo	137	Perda de água	Endo	174	-
HAP	Endo	13		Endo	53	-	-	-	-
AL	Endo	131	Perda de água de hidratação	Endo	268	Fusão	Exo	274	Decomposição
F108	Endo	61	Fusão	-	-	-	-	-	-
F108HA400AL	Endo	58	Fusão	Endo	125	Perda de água	Endo	145	Perda de água
F108HA200AL	Endo	59	Fusão	Endo	128	Perda de água	Endo	139	Perda de água
F108HAPAL	Endo	58	Fusão	Endo	126	Perda de água	Endo	181	-

Fonte: Autor.

4.3.5 Curvas e cinética de liberação do alendronato

Depois de analisadas as curvas dos outros dois materiais, foi realizada a curva de liberação para os compósitos hidroxiapatita porosa-F108-alendronato. A Figura 46 ilustra as curvas de liberação obtidas para as amostras de biocompósito hidroxiapatita-*Pluronic*[®]-alendronato.

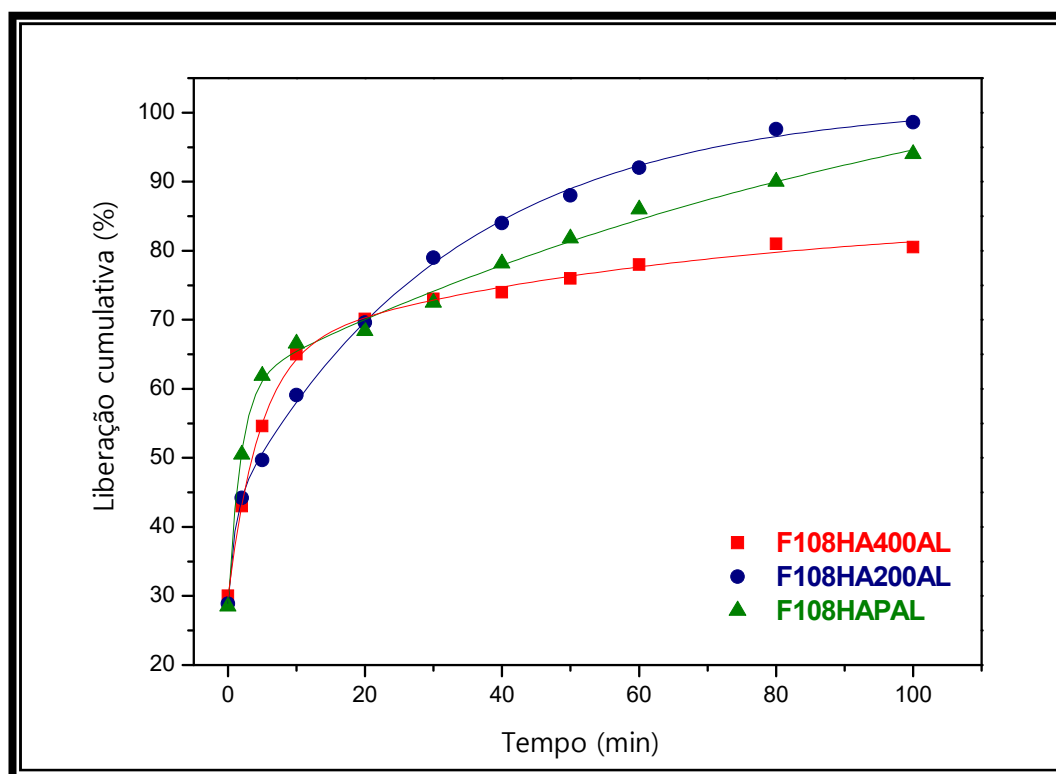


Figura 46 - Curvas de liberação das amostras F108HA400AL, F108HA200AL e F108HAPAL.
Fonte: Autor.

Observa-se que as amostras F108HA200AL e F108HAPAL, possuem uma liberação rápida, alcançando o máximo de liberação aproximadamente em 100 minutos. A amostra F108HA400AL apresenta um comportamento distinto das restantes, ela alcança um máximo de liberação de 80% em 80 minutos e permanece constante nesse valor, não alcançando o 100%. Medidas foram realizadas após 24h e a liberação continuou em 80%. O perfil de liberação dessa amostra se mostrou muito interessante, ela apresenta um *burst* inicial, e depois acredita que os 20% restantes do fármaco irão ser liberados apenas durante a remodelação óssea do tecido hospedeiro. No geral esses resultados indicam que a amostra F108HA400AL apresenta potencial para ser usada como enxerto ósseo. Obviamente, ainda se

fazem necessários mais testes, principalmente testes biológicos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A partir dos resultados de liberação foi aplicado o modelo cinético de Korsmeyer-Peppas. Esse modelo foi escolhido devido à natureza das amostras que possuem tanto um material poroso pouco solúvel quanto um polímero hidrofílico. O modelo de Korsmeyer-Peppas é geralmente usado para analisar a liberação quando o mecanismo não está bem esclarecido, ou quando mais de um fenômeno pode estar envolvido(125).

O gráfico plotado $\log (M_t/M_\infty)$ x $\log (t)$ (linearização através do logaritmo) para todas as amostras, está ilustrado na Figura 47.

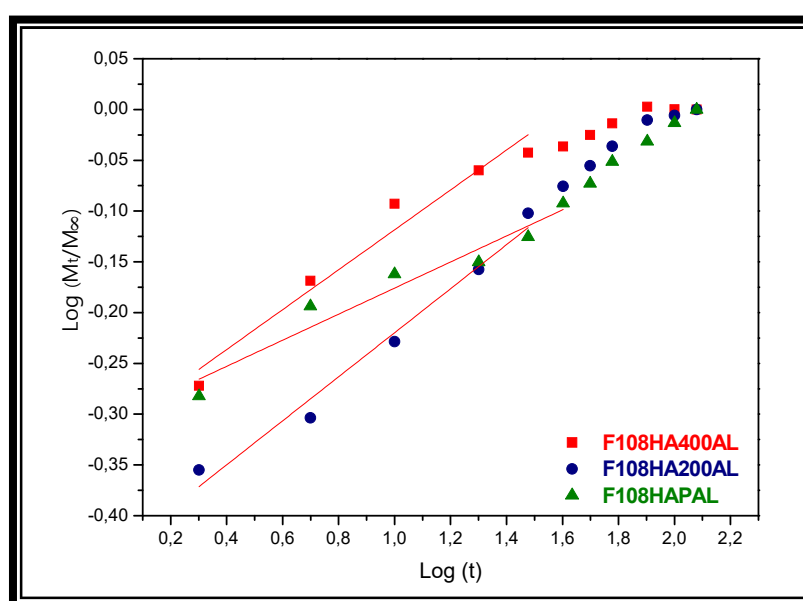


Figura 47 - Curvas da fração de fármaco liberado (M_t/M_∞) em função do tempo das amostras F108HA400AL, F108HA200AL, F108HAPAL.

Fonte: Autor.

Os valores obtidos de R^2 e η para cada amostra estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores obtidos a partir do ajuste linear do gráfico $\log (M_t/M_\infty)$ x $\log (t)$.

Amostras	R^2	η	K
F108HA400AL	0,95	$0,20 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,01$
F108HA200AL	0,97	$0,22 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,02$
F108HAPAL	0,93	$0,12 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,02$

Fonte: Autor.

Os coeficientes de correlação obtidos para as amostras foram 0,95; 0,97 e 0,93 para F108HA400AL, F108HA200AL e F108HAPAL respectivamente. O que mostrou uma linearidade baixa em relação ao modelo Korsmeyer-Peppas. A partir do coeficiente angular das curvas foram obtidos os valores de η . Observou-se para todas as amostras que o valor de η foi menor que 0,5. De acordo com Basak, Kumar e Ramalingam (158) valores de η abaixo de 0,5 indicam que o mecanismo que controla a liberação é quase Fickiano, ou seja, o mecanismo principal é a difusão do fármaco. Entretanto, o modelo não parece servir para descrever a cinética das amostras. O gráfico plotado, parece apresentar uma liberação em duas etapas, com a segunda parte linear.

5. CONCLUSÕES

O método da dispersão sólida foi usado para incorporar o fármaco alendronato na matriz polimérica formada por copolímeros de PEO-PPO. As análises de difratometria de raios X e calorimetria exploratória diferencial indicaram que houve a incorporação do fármaco, e que este se encontra em uma menor cristalinidade na matriz polimérica. Além disso pode-se concluir também que o alendronato se encontra melhor disperso, possivelmente em uma solução sólida na amostra F108AL2.

A preparação da hidroxiapatita porosa começou com a síntese das esferas de sílica. Utilizando o método de Stöber (75) foi possível sintetizar esferas de sílica de diferentes tamanhos na ordem de 200 e 400nm, as quais foram caracterizadas e usadas para preparar um molde empacotado de esferas. Os moldes foram preparados por sedimentação gravitacional e os resultados da microscopia eletrônica de varredura mostraram uma organização compacta e um empacotamento hexagonal das esferas no molde. Para a preparação da HA porosa utilizou-se os moldes de esferas de sílica e o precursor de HA, obteve-se um material com poros bem organizados e tamanhos na ordem de 350nm e 170nm utilizando moldes com esferas de sílica no tamanho de 400nm e 200nm respectivamente. Por meio da análise de difratometria de raios X foi possível confirmar a remoção da sílica bem como a presença da fase hidroxiapatita indicando que o método de preparação não modificou o material.

Utilizando as amostras de hidroxiapatita porosa, o alendronato foi diretamente incorporado nelas, baseando-se na interação do íon cálcio da hidroxiapatita com os íons fosfato e amina do alendronato. A análise de espectroscopia no infravermelho indicou a presença de bandas de amina indicando o sucesso na incorporação do fármaco na hidroxiapatita. As análises de DSC também indicaram a formação da interação.

Baseando-se nos resultados obtidos o polímero F108 foi escolhido para a modificação dos moldes porosos e incorporação do alendronato. As análises de infravermelho e DSC indicaram a presença da hidroxiapatita, do polímero e do fármaco. Com os resultados de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que todas as amostras foram eficazmente modificadas com o polímero.

Os resultados obtidos em relação às curvas de liberação para as amostras polímero-fármaco mostraram que o máximo de liberação foi alcançado em 120min, a amostra F68AL2 apresentou a liberação mais rápida alcançando quase 100% em 120 minutos e a amostra F108AL2 apresentou a liberação mais lenta liberando 90% em 120 minutos. O resultado foi coerente com a hidrofobicidade dos polímeros. Para as amostras hidroxiapatita-alendronato a incorporação do fármaco nas amostras porosas foi maior que 80% e para a amostra HAPAL foi de 60%. Já nas curvas de liberação, o máximo de liberação alcançado foi para a amostra sem poros com 35% em 72h, enquanto para as amostras porosas, onde a presença dos poros dificulta a difusão do fármaco, as curvas de liberação alcançaram um máximo de liberação de 24% em 72h. Para as amostras hidroxiapatita-*Pluronic*[®]-alendronato as amostras F108HA200AL e F108HAPAL alcançaram o máximo de liberação aproximadamente em 80 minutos. Já a amostra F108HA400AL apresentou um comportamento distinto, alcançou um máximo de liberação de 80% em 100 minutos e o restante não foi liberado mesmo depois de 24h.

Levando em consideração a aplicação biológica, o perfil de liberação das amostras de HA-AL são mais interessantes, a liberação lenta seria mais adequada para o tipo de aplicação desejada nesse trabalho. Entretanto os materiais com HA porosa-*Pluronic*[®]-alendronato, apesar da liberação rápida, possuem características interessantes: adicionar o polímero aumenta a resistência mecânica da cerâmica, existe a possibilidade de se adicionar outros tipos de fármaco inclusive hidrofóbicos, trabalhos indicam que esses copolímeros apresentam atividade antitumoral (78) o que ampliaria o uso desse material não somente para osteoporose. Sendo assim, conclui-se que os dois materiais tem potencial para a aplicação biológica.

Capítulo II

Ensaaios in vitro

1. INTRODUÇÃO - OBJETIVOS

Este segundo capítulo abordara os testes *in vitro*, realizados para os diferentes biocompósitos sintetizados e caracterizados no capítulo anterior.

Os ensaios *in vitro* foram todos realizados durante o período de doutorado sanduíche (seis meses), sob a supervisão da Prof^a Dr^a Elisabeth Engel no grupo *de Biomaterials for regenerative therapies*, no Instituto de Bioengenharia da Catalunha (IBEC-Barcelona). Durante os testes houve problemas com os biocompósitos HA-F108-AL, pois da maneira como foram preparados não eram estáveis por mais de 24h no meio de cultura. A solução foi sintetizar novos compósitos. Primeiramente para “dar forma” a HA, foram utilizados moldes de teflon e preparados discos de HA. Segundo, para aumentar a estabilidade do *Pluronic*[®] no meio de cultura, a ideia foi sintetizar um hidrogel com alginato. O alginato com a adição de cátions divalentes sofre reticulação produzindo géis com alta força mecânica, o que impediria uma rápida erosão do gel em contato com o meio de cultura, enquanto o *Pluronic*[®] ficaria protegido na rede do alginato.

Sendo assim, um novo biocompósito também foi preparado nessa etapa, composto por um disco de HA e hidrogel de alginato com *Pluronic*[®] o qual incorporaria o alendronato.

Desta maneira, os objetivos específicos desse capítulo são:

- Isolar osteoclastos da tíbia de ratos adultos e da calvária de ratos recém-nascidos e caracterizar;
- Isolar osteoblastos da calvária de ratos adultos e caracterizar;
- Semear os osteoclastos nos biocompósitos, quantificar (colorimetria da fosfatase ácida tartarato-resistente) e avaliar a sua atividade (atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente);
- Semear os osteoblastos nos biocompósitos e avaliar a sua atividade (atividade da fosfatase alcalina).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alginato

O alginato (ALG) é um polímero aniônico de ocorrência natural tipicamente obtido a partir de algas marrons, incluindo *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* (159–161) e várias cepas de bactérias (*Azotobacter*, *Pseudomonas*) (162). Este termo geralmente se refere ao ácido algínico e seus sais, mas também pode ser usado para todos os derivados do ácido algínico (159).

O alginato tem sido amplamente investigado e usado para muitas aplicações biomédicas, devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, custo relativamente baixo e reticulação pela adição de cátions divalentes como o Ca^{2+} (163). Os hidrogéis de alginato podem ser preparados por vários métodos de reticulação, e sua semelhança estrutural com matrizes extracelulares de tecidos vivos permitem aplicações amplas na cicatrização de feridas, entrega de agentes bioativos como pequenos fármacos e proteínas, e transplante de células. Os curativos para feridas com alginato mantêm um microambiente fisiologicamente úmido, minimizam a infecção bacteriana no local da ferida, e facilitariam a cicatrização. As moléculas de fármacos, desde pequenas moléculas químicas até proteínas macromoleculares, podem ser liberadas a partir de géis de alginato de maneira controlada, dependendo dos tipos de reticuladores e dos métodos de reticulação. Além disso, os géis de alginato podem ser administrados oralmente ou injetados no corpo de forma minimamente invasiva, o que permite aplicações variadas na indústria farmacêutica (164). Os géis de alginato também são promissores para o transplante celular na engenharia de tecidos. A engenharia de tecidos visa fornecer substituições de tecido e órgãos artificiais a pacientes que sofreram a perda ou falha de um órgão ou tecido (165). Nesta abordagem, os hidrogéis são usados para entregar as células ao local desejado, proporcionar um espaço para a formação de novos tecidos e controlar a estrutura e função do tecido manipulado (164,166).

O alginato é um copolímero linear constituído de resíduos de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) unidos por ligações do tipo 1-4. Estes podem estar dispostos em blocos homogêneos (poli-G, poli-M) ou heterogêneos

(MG). Com relação a fonte de origem do material, o ALG comercial pode diferir em composição e na sequência de blocos G e M (Figura 48) (159).

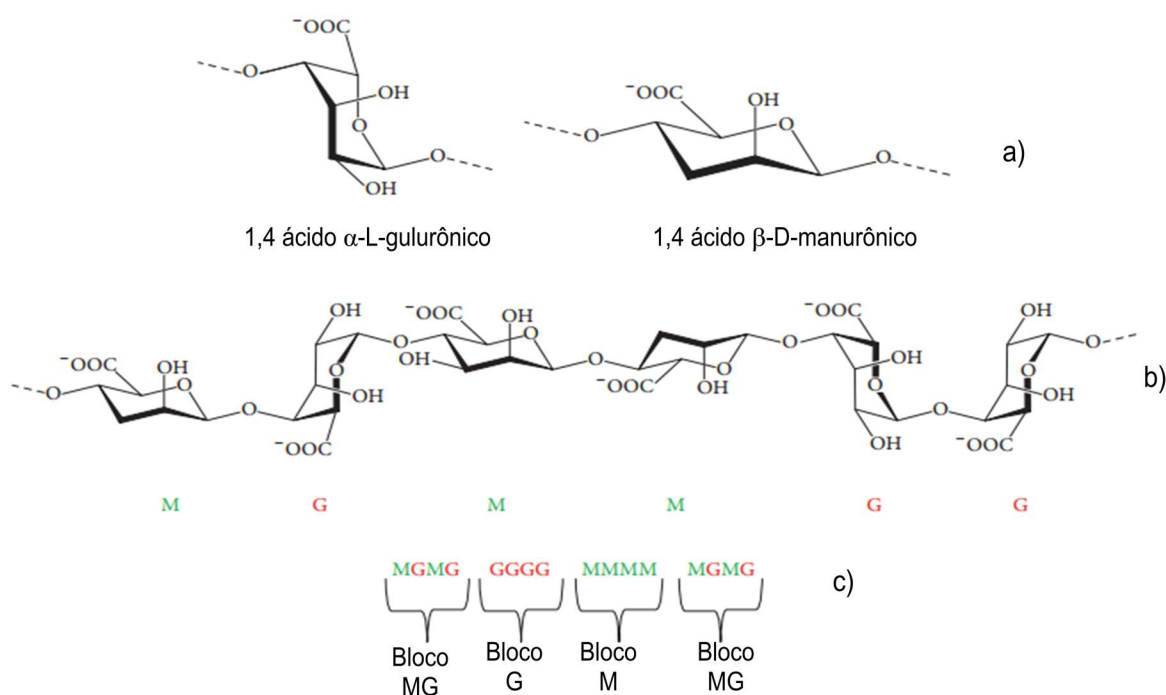


Figura 48 - Estrutura do ALG: (a) monômeros, (b) conformação da cadeia e (c) distribuição de blocos. **Fonte:** SZEKALSKA (2016, p. 2) (159).

O peso molecular dos alginatos de sódio comercialmente disponíveis varia entre 32.000 e 400.000 g/mol. Aumentar o peso molecular do alginato pode melhorar as propriedades físicas dos géis resultantes. No entanto, uma solução de alginato formada a partir de um polímero de alto peso molecular torna-se muito viscosa, o que muitas vezes não é desejável no processamento (167).

O alginato é tipicamente usado na forma de hidrogel em biomedicina. Os hidrogéis são redes tridimensionalmente reticuladas, compostas por polímeros hidrofílicos com alto teor de água. Os hidrogéis são frequentemente biocompatíveis, pois são estruturalmente semelhantes a componentes baseados em macromoléculas do corpo (168). A reticulação química e/ou física de polímeros hidrofílicos são abordagens típicas para formar hidrogéis e suas propriedades físico-químicas são altamente dependentes do tipo de reticulação e da densidade de reticulação, além do peso molecular e composição química dos polímeros (164,169).

O método mais comum para preparar hidrogéis a partir de uma solução aquosa de alginato é combinar a solução com agentes de reticulação iônicos, tais como cátions divalentes (isto é, Ca^{2+}). Acredita-se que os cátions divalentes se liguem apenas aos blocos de guluronato das cadeias do alginato, uma vez que a estrutura dos blocos de guluronato permitem um alto grau de coordenação aos íons divalentes (164). Os blocos de guluronato de um polímero formam então junções com os blocos de guluronato de cadeias de polímero adjacentes no que é chamado de modelo de reticulação de caixa de ovo, resultando em uma estrutura de gel (Figura 49) (170,171). O cloreto de cálcio (CaCl_2) é um dos agentes mais frequentemente utilizados para reticular ionicamente o alginato. Contudo, normalmente leva a uma gelificação rápida e mal controlada devido à sua elevada solubilidade em soluções aquosas. Uma abordagem para uma gelificação mais lenta e controlada é utilizar um tampão contendo fosfato, os grupos fosfato no tampão irão competir com os grupos carboxilato do alginato na reação com os íons cálcio, retardando assim a gelificação. O sulfato de cálcio (CaSO_4) e o carbonato de cálcio (CaCO_3), que possuem solubilidades mais baixas em água, também podem retardar a taxa de gelificação e ampliar o tempo de formação dos géis de alginato (164).

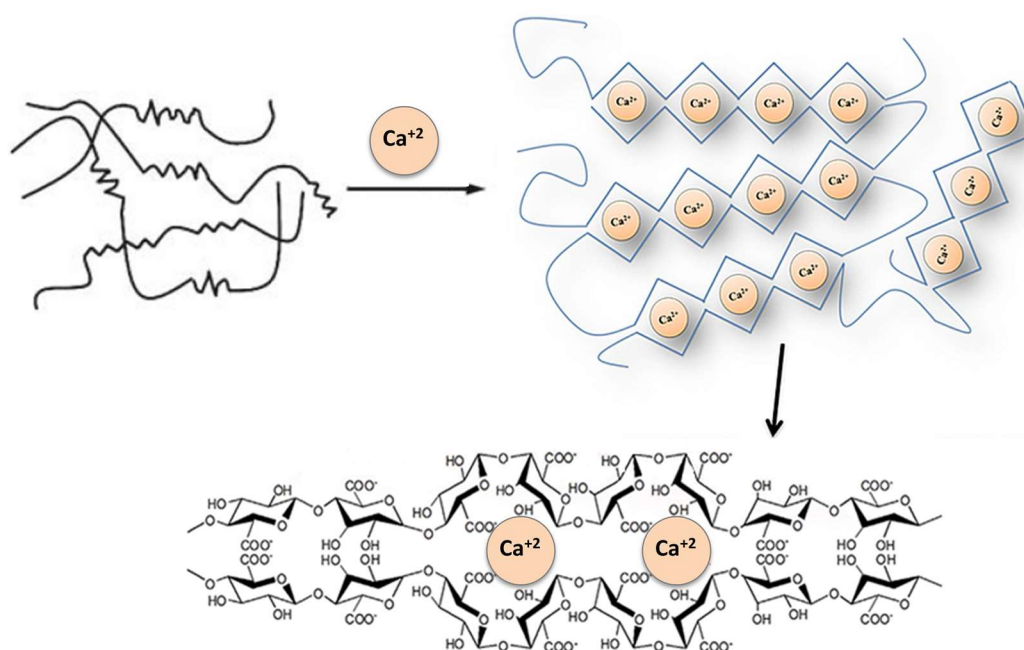


Figura 49 - Hidrogel de alginato preparado por reticulação iônica (modelo da caixa de ovo).
Fonte: JUÁREZ; SPASOJEVIC; FAAS; DE VOS (2014, p.5) (171).

A taxa de gelificação é um fator crítico no controle da uniformidade e força do gel ao usar cátions divalentes, e uma gelificação mais lenta produz estruturas mais uniformes e com maior integridade mecânica (172). A temperatura também influencia na taxa de gelificação e nas propriedades mecânicas dos géis. Em temperaturas mais baixas, a reatividade dos agentes de reticulação iônicos é reduzida e a reticulação torna-se mais lenta. A estrutura da rede resultante tem maior ordem, levando a propriedades mecânicas aprimoradas (173). Além disso, as propriedades mecânicas dos géis de alginato ionicamente reticulados podem variar significativamente de acordo com a estrutura química do alginato. Por exemplo, os géis preparados a partir de alginato com um alto teor de resíduos G apresentam maior rigidez do que aqueles com uma pequena quantidade de resíduos G (164).

Uma desvantagem crítica de géis de alginato ionicamente reticulados é a limitada estabilidade a longo prazo em condições fisiológicas, porque esses géis podem ser dissolvidos devido à liberação dos íons divalentes nos meios circundantes devido a reações de troca com cátions monovalentes (164).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e materiais

Os solventes empregados neste trabalho foram: etanol absoluto (Panreac, absoluto, grau PA), etanol 70% (Panreac) e água Mili Q. Todos os reagentes utilizados estão listados na Tabela 19.

Tabela 19 - Reagentes utilizados nos experimentos.

Reagentes	Fórmula molecular	Procedência
Pluronic® F-127	$(C_3H_6O \cdot C_2H_4O)_x$	Aldrich, MM 12.600
Alendronato de sódio	$C_4H_{18}NNaO_{10}P_2$	Galena
Polivinilpirrolidina	$(C_6H_9NO)_n$	Aldrich, MM 1.300.000
4-nitrofenilfosfato disodico	$C_6H_4NNa_2O_6P \cdot 6H_2O$	Aldrich, tablete
Hidróxido de sódio	NaOH	Panreac, PA
Alginato de sódio		Aldrich, algas marrons
β -glicerolfosfato	$C_3H_7Na_2O_6P \cdot xH_2O$	Aldrich, 99,0%
Cloreto de cálcio	$CaCl_2$	Aldrich, >96%
4',6-diamidino-2-fenilindol	$C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$	Aldrich, 98%
Solução Türk		Merk Millipore, contagem de leucócitos
Dexametasona	$C_{22}H_{29}FO_5$	Aldrich, >97%
L-ascorbico 2-fosfato	$C_6H_6Na_3O_9P \cdot xH_2O$	Aldrich, >95%
DMEM, α -MEM, Adv-MEM		Invitrogen Gibco
Soro fetal bovino		Invitrogen, EU aprovado (América do sul)
Fetal clone I		GE Healthcare
Penicilina e L-glutamina		Invitrogen
Tripsina (Tryple Express Stable)		Invitrogen Gibco
DMSO	$(CH_3)_2SO$	Aldrich, biologia molecular.
Alamar blue®		Trek Diagnostics Systems
Acetato de sódio	$C_2H_3O_2Na$	Aldrich, 99%
Tartarato de sódio	$C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$	Aldrich, <98%
Paraformaldeído		Electron Microscopy Sciences, solução 4%
Faloidina		Cytoskeleton
Vermelho de alizarina	$C_{14}H_7NaO_7S$	Aldrich, certificado para uso biológico.
Triton® X-100 BioXtra	$(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$	Aldrich, MM 625, MCM 80.000

Fonte: Autor.

3.2 Preparação dos discos de hidroxiapatita

Para a realização dos testes *in vitro* foi necessária uma adaptação da preparação das amostras, conforme foi descrito na introdução do capítulo e mais explicações serão dadas nos resultados e discussão. Sendo assim a hidroxiapatita porosa (HA400) foi macerada até a obtenção de um pó muito fino, 100mg desse pó foi misturado a 100µl de uma solução de polivinilpirrolidina 10% em água, a mistura foi colocada em moldes de teflon, com formato circular (diâmetro de 0,5 cm e espessura de 0,5 cm). O material foi deixado secar a temperatura ambiente durante 24h, e depois retirado do molde. Os discos obtidos foram submetidos a um tratamento térmico a 700°C durante 2h para a eliminação da matéria orgânica.

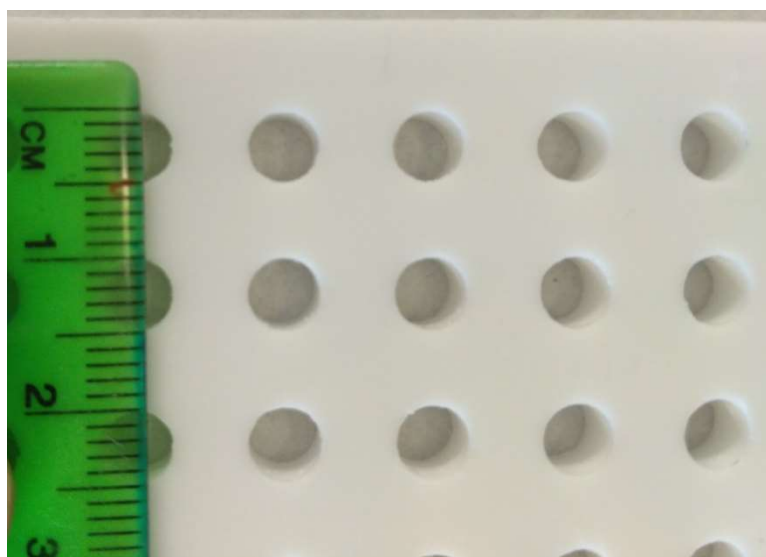


Figura 50 - Fotografia do molde de teflon utilizado para a preparação dos discos de HA.
Fonte: Autor.

3.3 Preparação do compósito hidroxiapatita-alendronato

Em um *ependorf* foi adicionado um disco (100mg) da amostra de hidroxiapatita porosa. Uma solução de alendronato (10mg/mL) foi preparada previamente e uma alíquota dessa solução foi adicionada ao *ependorf*, dependendo da concentração desejada. A mistura foi encubada a 200 rpm durante 24h a 37°C. Subsequentemente o compósito hidroxiapatita-alendronato foi lavado com água e centrifugado a 9000 rpm por quatro minutos para remover o fármaco

que ficou apenas adsorvido fisicamente, o procedimento foi repetido três vezes. Foram preparadas duas amostras, uma com 1mg de alendronato e outra com 0,1mg que foram nomeadas de HAAL-1,0 e HAAL-0,1.

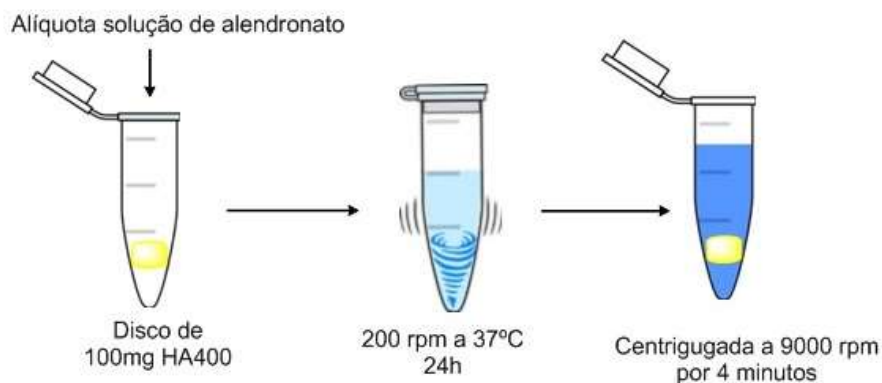


Figura 51 - Esquema da preparação do compósito HAAL.

Fonte: Autor.

3.4 Preparação do gel alginato-*Pluronic*[®]

O gel de alginato-*Pluronic*[®] foi preparado com uma porcentagem (m/m) em água de 2% de alginato e 18% de *Pluronic*[®] F127. A 7°C sob agitação constante, o pó de alginato foi adicionado lentamente na água até sua total solubilização, subsequentemente o *Pluronic*[®] F127 foi adicionado e mantido sob agitação até a formação de um gel transparente. Antes de ser utilizado o gel ficou armazenado a 4°C durante 24h. Também foi preparado um gel com alendronato. No geral, a preparação se deu da mesma maneira do que o gel anterior, a diferença é que uma quantidade determinada de alendronato foi solubilizada na água, antes do alginato ser adicionado. A concentração final de alendronato no gel era de 1mg/mL.

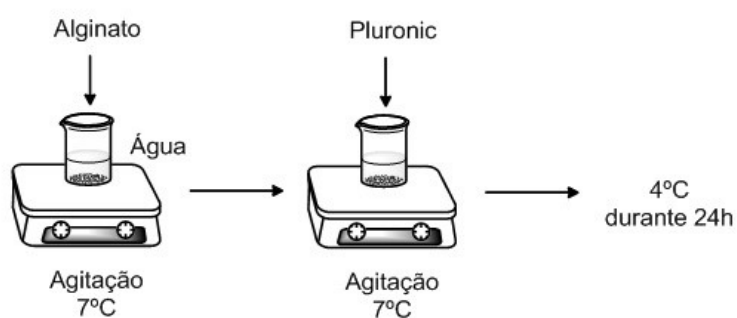


Figura 52 - Esquema da síntese do gel alginato-*Pluronic*[®].

Fonte: Autor.

Sendo assim duas amostras foram preparadas a GEL (alginato + F127) e a GELAL (alginato + F127 + alendronato).

3.5 Preparação do compósito hidroxiapatita-gel-alendronato

Para a preparação do biocompósito, 100mg do gel foi adicionado em um poço (placa com 96 poços) contendo um disco de hidroxiapatita. O biocompósito foi então incubado a 37°C por no mínimo uma hora. 100µL de CaCl₂ foi adicionada para realizar a reticulação do alginato, e o compósito foi incubado novamente a 37°C agora durante no mínimo 3h. Foram preparadas duas amostras, uma com HA e o gel sem alendronato e outra com HA e o gel com alendronato, estas foram nomeadas de HAGEL e HAGELAL.

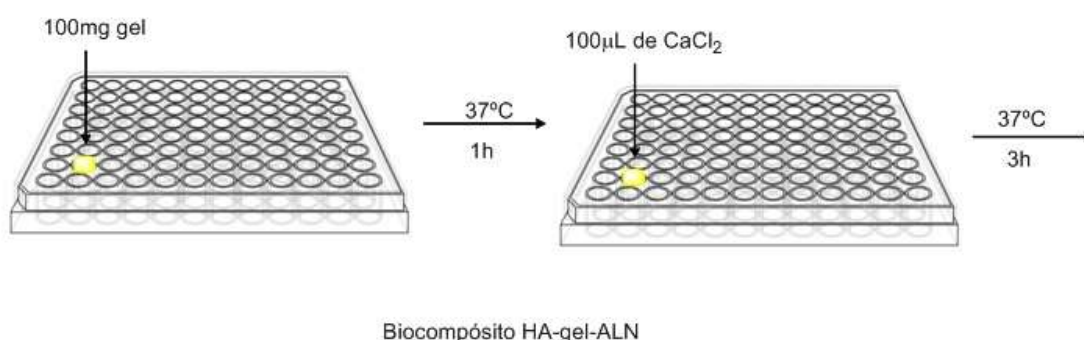


Figura 53 - Esquema de preparação do compósito HAGEL e HAGELAL.
Fonte: Autor.

3.6 Esterilização das amostras

Antes de realizar os testes com as células, todas as amostras foram esterilizadas com etanol 70% e uv-vis. As soluções utilizadas foram filtradas em membranas de 20µm.

3.7 Procedimentos com células

Durante os testes *in vitro*, foram utilizados quatro tipos diferentes de células e diferentes procedimentos de análise.

3.7.1 Meios de cultura

As composições de todos os meios de cultura utilizados para a realização dos experimentos foram listados na Tabela 20.

Tabela 20 – Meios de cultura utilizados durante os experimentos.

Células/tipo de meio	Composição dos meios de cultura
Osteoclastos/ normal	α -MeM, 5% fetal clone I e 1% penicilina
Osteoclastos/ osteoclastogênese	α -MeM, 5% fetal clone I, 1% penicilina, 60 ng/mL M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos) e 40 ng/mL Rank-L (ligante do receptor ativador de fator nuclear κ B).
Osteoblastos/ normal	DMeM, 10% soro fetal bovino, 1% penicilina e 1% L-glutamina
Osteoblastos/ osteogênico	α -MeM, 10% soro fetal bovino, 1% penicilina, 1% L-glutamina, 1mM dexametasona, 10mM β -glicerolfosfato e 100 μ M ácido L-ascorbico 2-fosfato.
Fibroblastos / normal	DMeM, 10% soro fetal bovino, 1% penicilina e 1% L-glutamina.
Mesenquimais/ normal	Advanced MeM, 10% soro fetal bovino, 1% penicilina e 1% L-glutamina

Fonte: Autor.

3.7.2 Isolamento osteoclastos

Neste trabalho os osteoclastos foram isolados de duas maneiras, da tíbia de ratos (C57/bl6) de seis semanas e da calvária de ratos (C57/bl6) recém nascidos, entretanto o procedimento realizado foi o mesmo.

Imediatamente após o isolamento dos ossos, estes foram limpos e cortados dentro de uma placa de petri contendo 3mL de meio de cultura normal com 100 μ l de heparina. Os fragmentos foram então recolhidos e passados para um almofariz contendo 5mL do meio de cultura. Com um pistilo, os ossos foram macerados até observar que todo o sangue foi liberado. Utilizando uma seringa de 5mL com agulha de 21G, a solução foi sugada e esguichada sob os ossos pelo menos 3 vezes até a obtenção de uma solução homogênea. Subsequentemente, a solução foi pipetada,

filtrada (filtro celular) e coletada em um tubo de 50mL. Mais 5mL do meio de cultura foi adicionado no almofariz e o procedimento foi repetido até a coleta no tubo da centrifuga. As células em suspensão coletadas foram centrifugadas a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi gentilmente resuspendido com 10mL de meio de cultura e a solução foi centrifugada novamente.

Após descartar o sobrenadante o pellet foi resuspendido novamente em 1mL de meio de cultura. Em seguida, em um *ependorf* 4ul da solução celular foi pipetada com 16ul de solução *Türk* (colore as celular nucleadas), a mistura foi agitada e adicionada na câmara de *Neubauer* para contagem celular.

Após a contagem, as células foram diluídas para uma concentração de $1,3 \cdot 10^6$ células/mL. Em uma placa de 96 poços, 75 μ l da suspensão celular foi semeada em cada poço com 75 μ l de meio para osteoclastogênese. A metade do meio de cultura foi trocada durante sete dias.

A Figura 54 ilustra uma fotografia tirada durante o procedimento de isolamento dos osteoclastos. Na Figura 54(a) é possível observar os ossos da tíbia dos ratos na placa de petri e na Figura 54(b) os ossos já macerados dentro do almofariz.

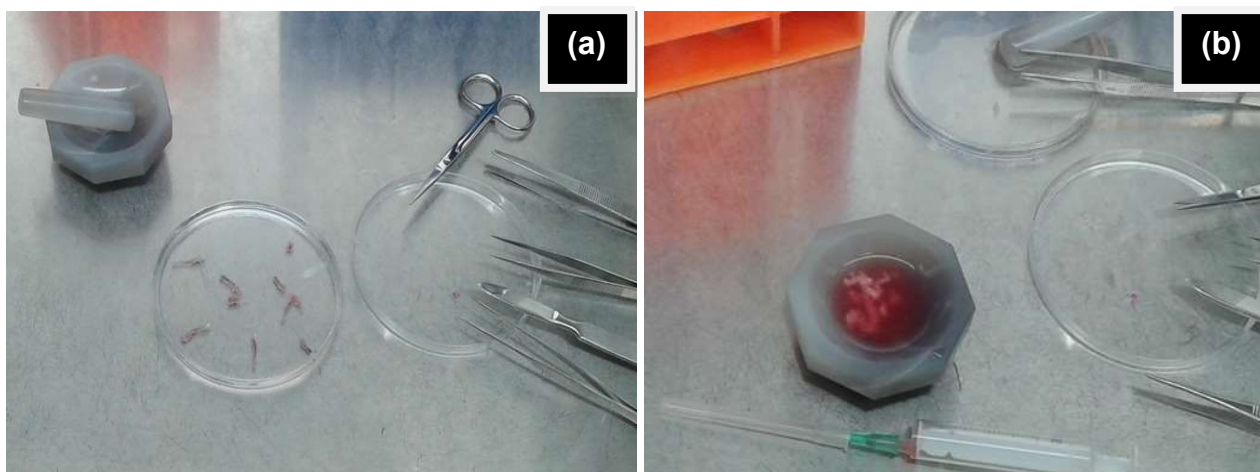


Figura 54 - Fotografias do procedimento de isolamento dos osteoclastos (a) e (b).

Fonte: Autor.

3.7.3 Isolamento osteoblastos

Neste trabalho os osteoblastos foram isolados da calvária de ratos (C57/bl6) de seis semanas.

Em sequência a remoção das calvárias, estas foram incubadas em um banho agitador (80 rpm) a 37°C durante 20 minutos, em um tubo contendo 10mL de meio de cultura normal com 1mg/mL de colagenase. Após a incubação, o meio de cultura foi aspirado e descartado tomando cuidado para não encostar nas calvárias. Mais 10mL do meio com colagenase foi adicionado no tubo e as calvárias incubadas novamente a 80 rpm por 20 minutos a 37°C. Mais uma vez a solução foi descartada e o procedimento anterior repetido só aumentando o tempo de incubação para 30 minutos. Ao final da terceira digestão, a solução celular foi pipetada, filtrada e coletada em um tubo de 50 mL. Foram realizadas mais duas digestões nas calvárias repetindo todo o procedimento, as digestões 4 e 5 também foram coletadas no tubo de 50mL. Ao final de todas as coletas, a suspensão celular foi centrifugada a 300g por 5 minutos e o pellet resuspenso em 15mL de meio de cultura, as células foram contadas e semeadas em uma placa com 24 poços, com média de 20.000 células por poço durante 21 dias. O meio de cultura osteogênico foi trocado a cada três dias.

3.7.4 Fibroblastos e células mesenquimais

Os fibroblastos e as células mesenquimais utilizadas neste trabalho não foram isoladas, foram utilizadas células que já pertenciam ao grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Elisabeth Engel, com um passagem de no máximo sete.

3.7.5 Tripsinização e criopreservação

O procedimento de tripsinização é usado para remover as células cultivadas (aderidas) em um frasco quando estas estão confluentes. Depois de tripsinizadas as células podem ser cultivadas em outro frasco ou criopreservadas. Durante os testes celulares esse procedimento foi realizado para contar e semear quantidades específicas de células, o restante que não era utilizado passava por um processo de criopreservação. Para a tripsinização as células que estavam confluentes foram lavadas duas vezes com tampão fosfato e submetidas a uma solução de tripsina durante 5 minutos a 37°C. Em seguida a enzima foi inativada pela adição de meio de cultura. A suspensão celular foi pipetada, coletada e centrifugada a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet resuspenso, e as células foram

contadas e semeadas nas amostras ou em outros frascos, de acordo com o que era necessário. As células em suspensão restantes para serem criopreservadas foram centrifugadas novamente a 300g por 5 minutos, e após o sobrenadante ser descartado uma mistura de 0,9mL de soro fetal bovino com 0,1mL de DMSO foi adicionada, a solução foi então pipetada para um tubo de criopreservação, e este submetido a um abaixamento criostático até atingir a temperatura de -70°C durante 24h, para depois ser armazenado em nitrogênio líquido.

3.7.6 Semeação das células nas amostras

Antes de semear as células, os biocompósitos foram esterilizadas com uv durante 20 minutos e incubadas a 37°C com meio de cultura por 30 minutos. Com a suspensão celular já preparada e concentração conhecida, o meio anterior foi retirado e a quantidade específica de célula foi semeada sobre as amostras. Após 30 minutos de incubação foi adicionado meio de cultura suficiente para cobrir as amostras.

Os tempos de cultura de cada tipo de célula com as amostras variaram muito dependendo do ensaio utilizado, por isso estes serão descritos durante os resultados e discussões de cada teste. Sempre que uma quantidade de células era semeada nas amostras também era semeada a mesma quantidade em poços vazios como controle.

3.7.7 Ensaio

3.7.7.1 Viabilidade celular - Alamar blue®

Um dos testes realizados para medir a viabilidade celular foi o do *alamar blue*®. O *alamar blue*® é um indicador de oxi-redução que usa o poder redutor das células vivas para medir quantitativamente a proliferação das mais diversas linhagens celulares tanto humanas quanto animais. A resazurina princípio ativo do *alamar blue*®, um composto azul e virtualmente não fluorescente, permeia dentro da célula e se reduz a resorufina, um composto rosa e altamente fluorescente (Figura 56). O mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não está bem esclarecido,

entretanto acredita-se que este ocorra por reações químicas ou enzimáticas em células viáveis (174). Um dos mecanismos propostos é que nas mitocôndrias, as enzimas mitocondriais, portadoras de atividades diaforase, como a NADPH desidrogenase, são provavelmente responsáveis pela transferência de elétrons de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ para resazurina, que é reduzida a resorufina. Sendo assim, com esse ensaio, por meio de uma curva padrão é possível determinar quantitativamente o número de células usando tanto fluorescência como absorbância (174).

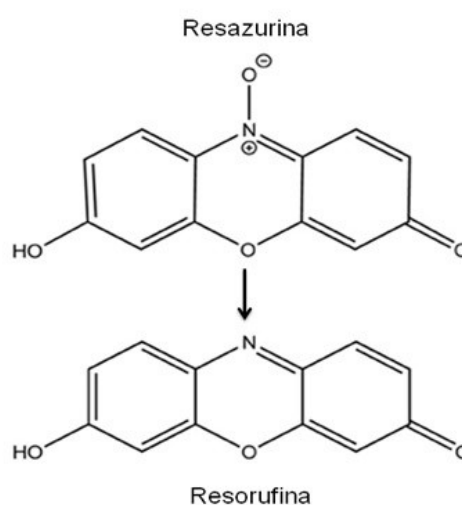


Figura 55 - O *alamar blue*[®] não reduzido corresponde à resazurina, e reduzido corresponde a resorufina.

Fonte: Autor.

Para a curva padrão, números de células conhecidos foram semeados em uma placa com 24 poços, todos em triplicata. Após 4h de incubação a 37°C, tempo para que as células se aderissem a placa, o meio de cultura foi retirado e substituído por 400µl de uma solução 10% *alamar blue*[®] em meio de cultura. A placa foi coberta com papel alumínio para proteger da luz e foi incubada a 37°C por mais 4h. Em um ambiente sem luz, 100µl de cada poço foi pipetado para uma placa de 96 poços, o procedimento foi realizado em triplicata. A fluorescência das soluções presentes na placa foram medidas em um leitor de microplaca (Infinite M200 Pro) com uma intensidade de excitação de 530 e uma emissão de 590.

O procedimento para as amostras foi basicamente o mesmo realizado para a curva padrão. Utilizando amostras com células previamente aderidas, o meio de cultura foi substituído por 400µl da solução de *alamar blue*[®], após 4h incubadas 100µl de cada poço foi pipetado para uma placa de 96 poços e a fluorescência foi

medida por meio de um leitor de microplacas (Infinite M200 Pro). O ensaio de viabilidade foi realizado no mínimo um dia depois que as células foram semeadas nas amostras, ao final do ensaio, as amostras foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato e incubadas com meio de cultura. Visto que o *alamar blue*[®] não é tóxico para as células e é facilmente removido após algumas lavagens o cultivo das células não era afetado após o ensaio.

3.7.7.2 Atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP)

A fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) é uma enzima lisossomal com um centro metálico (ferro) presente nos ossos e cartilagens (175). Ela é usada como um marcador da atividade osteoclástica e da reabsorção óssea (176).

Os ensaios de TRAP foram utilizados para medir a atividade dos osteoclastos. O procedimento foi baseado no trabalho de Janckila et. al. (176) com algumas modificações. Após quatro dias nos quais os osteoclastos foram semeados e cultivados nas amostras, 50 µl do meio de cultura foi incubado a 37°C durante uma hora em 150µl de substrato. O substrato consistia em uma solução de 7,6mmol/L de 4-nitrofenilfosfato em 100mmol/L de tampão acetato de sódio e 50mmol/L de tartarato de sódio ajustado em um pH de 5,9. A reação foi parada adicionando 50µl de uma solução de NaOH 3M e a absorbância foi medida em uma leitor de microplaca (Infinite M200 Pro) em 405 nm.

3.7.7.3 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolase que catalisa a hidrólise de ésteres fosfatos sob meio alcalino. Alterações no nível e na atividade dessas enzimas estão relacionadas a uma variedade de eventos fisiológicos e patológicos, tais como o desenvolvimento de ossos, doenças ósseas, inflamação no intestino entre outros (177).

O ensaio de atividade da fosfatase alcalina foi usado em células mesenquimais para determinar se houve indução na diferenciação dessas células em osteoblastos.

Para esse ensaio, grupos de diferentes amostras foram preparados em três placas de 96 poços, em cada placa foram colocadas três amostras do biocompósito HAGEL e três HAGELAL, após a semeadura das células mesenquimais, o ensaio foi realizado nos dias 3, 8 e 16 utilizando para cada dia uma placa diferente.

O kit utilizado no ensaio foi o *Sensolyte pNPP Alkaline Phosphatase* (AnaSpec). As amostras foram lavadas duas vezes com tampão fosfato e adicionadas a *ependorfs* contendo 250µl de uma solução gelada de triton em 1x tampão (20µl triton X-100 + 1mL 10X tampão + 9mL de água destilada). Com um pestilo, as amostras foram trituradas e homogeneizadas na solução. Subseqüentemente, os *ependorfs* foram centrifugados a 10.000g a 4°C por 15 minutos e os sobrenadantes coletados para o ensaio de ALP.

O kit fornecia uma solução *standard* com a qual era possível preparar uma curva padrão, os pontos utilizados foram 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 2,5; 5 e 10 ng/poço.

A curva foi preparada junto com as amostras. Dessa maneira 50µl dos sobrenadantes das amostras ou 50µl da solução padrão (já com a concentração certa) foram incubados a temperatura ambiente por 30 minutos em 50µl de uma solução de p-nitrofenilfosfato. Ao final, 50µl da solução *stop* foi adicionada e as soluções foram agitadas por um minuto antes da leitura de absorbância em 405nm (leitor de microplaca Infinite M200 Pro).

3.7.7.4 Ensaio colorimétrico (*Staining assays*)

Esses ensaios consistiam em “colorir” as células, no geral suas organelas, com diferentes substâncias que adicionassem cor ou fluorescência. As micrografias desses ensaios foram obtidas em um microscópio estereoscópico MZ10F Leica e microscópio eclipse E600 Nikon.

3.7.7.4.1 Fixação das células

Antes de realizar qualquer tipo de ensaio colorimétrico, era necessário realizar a fixação das células nas amostras ou nas placas, quando se tratava dos controles. A fixação mata as células, entretanto preserva a estrutura do tecido o mais próximo possível do seu estado natural. Para realizar o procedimento, as amostras foram

lavadas duas vezes com tampão fosfato a 37°C e encobertas com paraformaldeído durante 10 minutos. Ao final, o paraformaldeído foi retirado e as amostras lavadas três vezes com tampão fosfato. Caso o ensaio colorimétrico não fosse realizado na hora, as amostras eram armazenadas a 4 °C com tampão fosfato.

3.7.7.4.2 Fosfatase ácida tartarato-resistente (*TRAP*) staining

Ensaio colorimétrico específico para a detecção de osteoclastos. O *TRAP staining* resulta em um precipitado colorido que pode ser facilmente visualizado em um microscópio ótico (178).

Para esse ensaio foi utilizado o kit *Acid Phosphatase, Leukocyte* (Sigma-Aldrich). Antes de começar o ensaio, em um tubo protegido da luz foi preparada uma solução com 50µl de o-aminoazotolueno (*fast garnet GBC*) e 50µl de nitrito de sódio. A solução foi agitada por 30 segundos e mantida sob a bancada por pelo menos 2 minutos antes de ser utilizadas. Sob as células já fixadas foi adicionado 400 µl de uma solução aquecida a 37°C preparada com 4,5mL de água destilada, 0,1mL da solução de o-aminoazotolueno com nitrito de sódio, 50 µl de naftol AS-BI fosfato, 0,2mL de solução de acetato e 0,1mL da solução de tartarato. As amostras foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 37°C durante uma hora. Ao final as amostras foram lavadas duas vezes com tampão fosfato e observadas em um microscópio ótico.

3.7.7.4.3 DAPI

O 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) é uma substância química usada como ensaio de coloração para ácido nucléicos (núcleo e cromossomos), ela se liga a regiões AT do DNA e emite uma fluorescência azul (179). Para o ensaio de DAPI, uma solução 200x DAPI com tampão fosfato foi preparada em um tubo protegido da luz, 300µl dessa solução foi adicionado nas amostras ou controles já fixados e incubada por 2 minutos a temperatura ambiente. Por último o material foi lavado duas vezes com tampão fosfato.

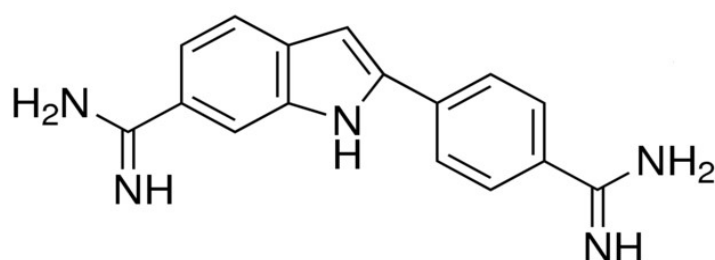


Figura 56 - Estrutura do DAPI.
Fonte: Autor.

3.7.7.4.4 Faloidina (verde)

A faloidina é uma substância que se liga as moléculas de actina do citoesqueleto e emite uma fluorescência verde (180).

Para esse ensaio, após fixar as células foi realizada uma permeabilização. As amostras foram lavadas duas vezes com uma solução de tampão fosfato com glicina e encobertas com uma solução de 0,1% triton 100-X em tampão fosfato com glicina por 7 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas novamente 3 vezes com tampão fosfato com glicina e incubadas em uma solução de 200x faloidina em tampão fosfato. Ao final, para retirar o excesso de faloidina foram realizadas duas lavagens com tampão fosfato.

3.7.7.4.5 Vermelho de Alizarina

O vermelho de alizarina é uma substância que colore a matriz extracelular rica em cálcio (181). Ela é usada como teste positivo para osteoblastos.

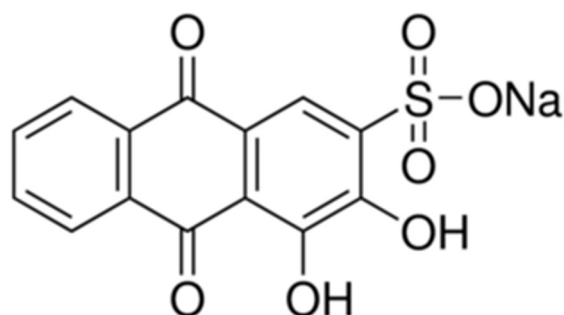


Figura 57 - Estrutura do vermelho de alizarina.
Fonte: Autor.

Para esse ensaio, as células foram incubadas em uma solução 1% alizarina em água (pH 4,2) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Ao final, foram realizadas no mínimo três lavagens com água até que todo o excesso de alizarina fosse retirado.

3.7.8 Microscopia eletrônica de varredura de amostras biológicas

A análise de microscopia eletrônica de varredura para amostras biológicas requer um tratamento prévio diferenciado. A secagem das amostras foi realizada através do procedimento de ponto crítico. Nesse procedimento a água do tecido biológico é substituída por um fluido inerte adequado cuja temperatura crítica para a pressão utilizada é apenas um pouco acima da temperatura ambiente. A escolha desses fluídos é severamente limitada e o CO₂ é universalmente utilizado hoje em dia. Apresenta um ponto crítico em aproximadamente 31,1°C que pode ser obtido a uma pressão de 1.200 psi. Portanto, se a água é substituída por CO₂ líquido e a temperatura aumentada em seguida para acima da temperatura crítica, o CO₂ líquido passa para vapor sem alteração da densidade e, portanto, sem os efeitos de tensão superficial que distorcem a morfologia e a ultra-estrutura (182).

Uma vez que o CO₂ líquido não é suficientemente miscível com a água, é necessário utilizar um fluido intermediário que é miscível com a água e o CO₂ líquido. Na prática os fluidos intermediários utilizados são metanol, etanol, e acetona.

Antes de realizar o procedimento de ponto crítico, as amostras já fixadas passaram por um procedimento de desidratação em gradiente de etanol. Elas foram imersas em soluções contendo 40%, 60%, 80%, 95% e 100% de etanol por 5 minutos, e armazenadas com etanol absoluto a 4°C até que fossem levadas para o equipamento de ponto crítico. As amostras já secas foram transferidas para porta amostras de alumínio e cobertas com carbono.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de estabilidade do biocompósito Hidroxiapatita-*Pluronic*[®]-alendronato

Para os testes *in vitro* é necessário semear as células na superfície do material e este tem que se manter estável até o final do cultivo. A estabilidade do biocompósito hidroxiapatita-*Pluronic*[®]-AL preparado previamente foi testada incubando o material com meio de cultura durante 24h a 37°C. A Figura 58 ilustra uma fotografia tirada após as 24h.

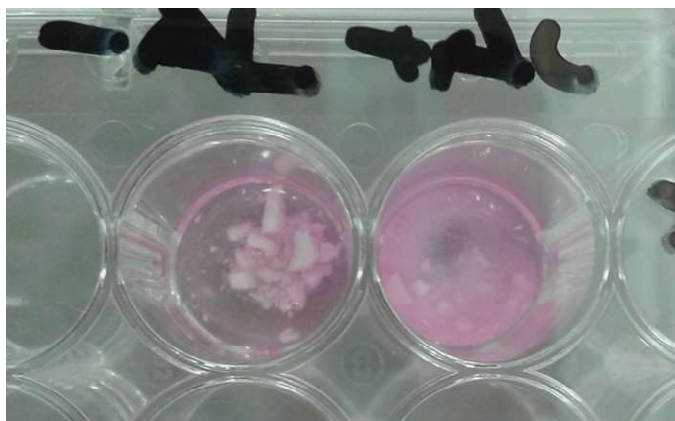


Figura 58 - Fotografia do biocompósito hidroxiapatita-*Pluronic*[®]-AL após 24h incubadas no meio de cultura.

Fonte: Autor.

O bicomposto foi preparado a partir de uma mistura do polímero fundido com o pó de hidroxiapatita. Devido à hidrofiliabilidade do *Pluronic*[®] F108, o material vai se solubilizando no meio de cultura com o passar do tempo. Após 24h ele não mantém mais seu formato inicial, impossibilitando o uso desse material para o cultivo, pois as células precisam de uma superfície para aderir e proliferar-se. Para contornar esse problema, a ideia foi utilizar um molde de teflon para preparar a hidroxiapatita. Com o molde, todas as amostras possuiriam o mesmo formato e mesma área superficial. Era necessário então preparar uma solução do pó de hidroxiapatita com um polímero que tivesse viscosidade o suficiente para manter-se no molde e que fosse fácil de remover, por isso foi escolhido a polivinilpirrolidona.

As amostras foram então preparadas com uma mistura do pó da amostra HA400 com 10% em água de PVP. Foram colocadas em um molde de teflon e tratadas termicamente a 700°C. A Figura 59 ilustra a fotografia de um disco de hidroxiapatita preparado com o molde. Os discos apresentavam bom formato, não quebradiços e sua coloração branca indicava que toda a matéria orgânica proveniente da polivinilpirrolidona havia sido removida.



Figura 59 - Fotografia do disco de hidroxiapatita preparado com o molde de teflon.
Fonte: Autor.

Visto os bons resultados preliminares, os discos foram incubados a 37°C com o meio de cultura durante alguns dias para testar sua estabilidade. Após sete dias, os discos ainda mantiveram sua forma, e nenhuma alteração foi observada (Figura 60). Com esse resultado iniciou-se a preparação das amostras a partir dos discos de HA para a realização dos testes.

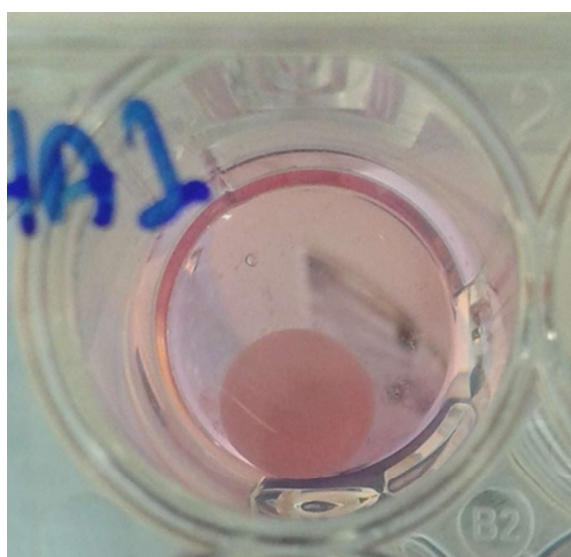


Figura 60 - Fotografia do disco de hidroxiapatita após sete dias incubado com meio de cultura.
Fonte: Autor.

4.2 Primeiro isolamento de osteoclastos e osteoblastos

Quando foi realizado o primeiro isolamento dos osteoblastos e dos osteoclastos, o problema das amostras ainda não estava resolvido. Dessa maneira a solução foi congelar a maioria das células para que estas pudessem ser usadas posteriormente.

Antes de realizar a criopreservação, algumas células de cada tipo foram cultivadas para observar se os tipos corretos de células haviam sido isolados. No caso dos osteoclastos o que se isola é seu precursor, são necessários então aproximadamente sete dias de cultivo com meio indutor de osteoclastogênese para que os osteoclastos se tornem células gigantes e multinucleadas. A Figura 61 ilustra as micrografias de fluorescência, obtidas dos osteoclastos cultivados durante seis dias, no meio indutor. A fluorescência verde é da faloidina e a azul do DAPI, uma célula pode ser considerada um osteoclasto quando ela possui mais de três núcleos. É possível observar tanto na Figura 61 (a) como (b) pelo menos três osteoclastos em cada micrografia.

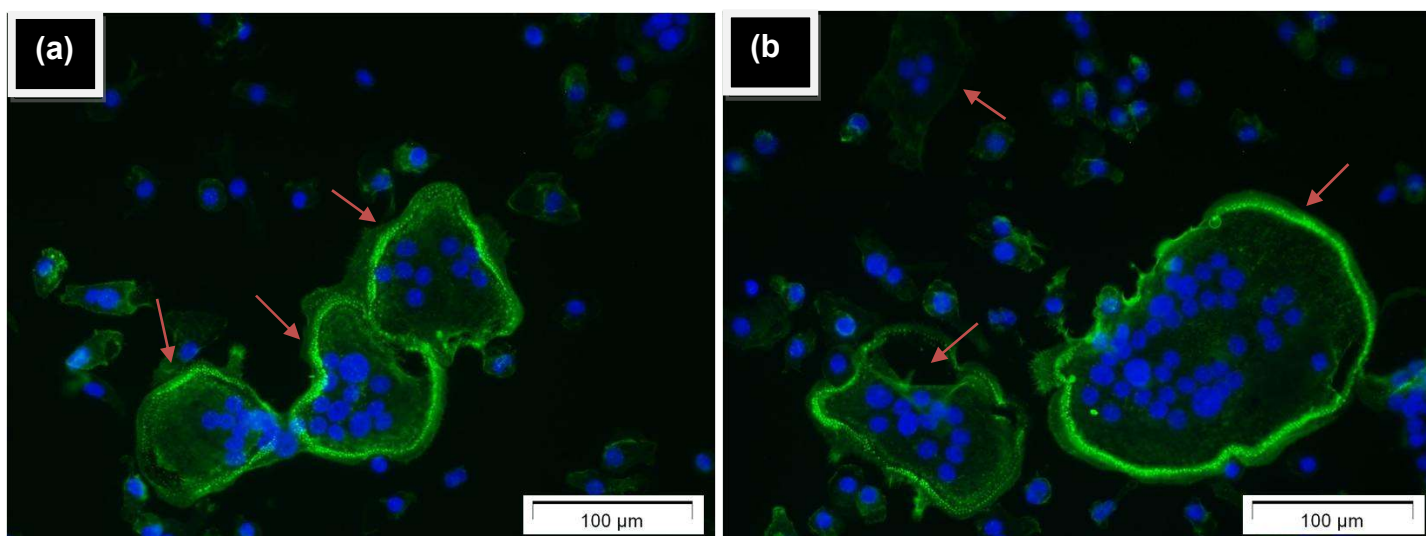


Figura 61 - Micrografias de fluorescência dos osteoclastos com faloidina e DAPI (a) e (b).
Fonte: Autor.

O ensaio de colorimetria *TRAP* específico para osteoclastos também foi realizado. As células coloridas são o positivo para os osteoclastos. Na micrografia (Figura 62) observa-se pelo menos quatro osteoclastos gigantes multinucleados.

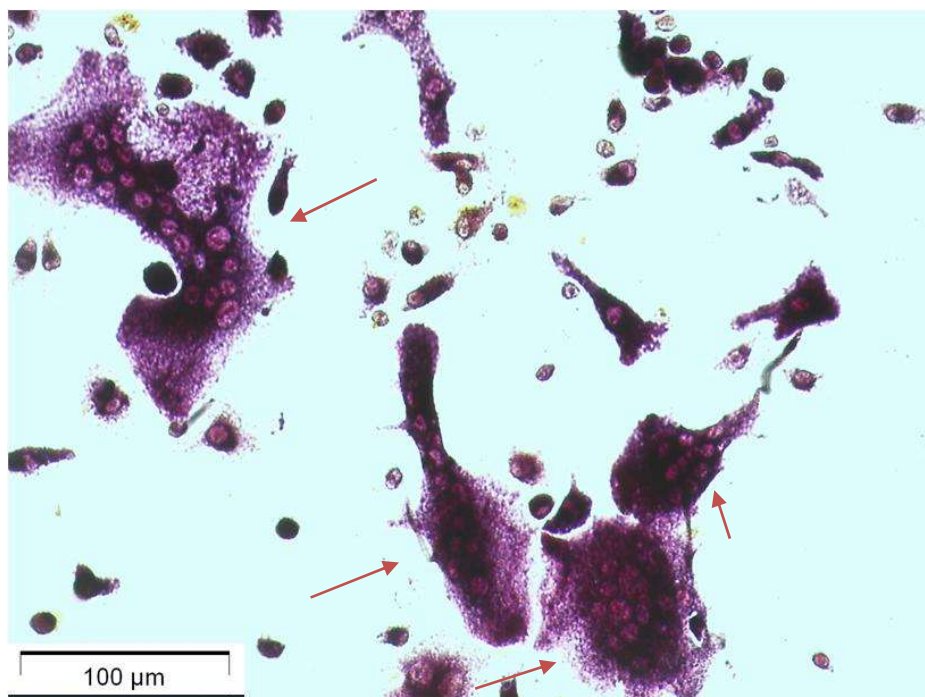


Figura 62 - Micrografia dos osteoclastos coloridos para TRAP.
Fonte: Autor.

O tempo de cultivo dos osteoblastos é de 21 dias no meio osteogênico após seu isolamento. Nesse primeiro momento, os osteoblastos isolados foram cultivados por apenas alguns dias e sua morfologia foi observada. A Figura 63 ilustra a micrografia obtida dois dias após o isolamento dos osteoblastos. Os osteoblastos são células mononucleadas cubóides ou ligeiramente alongadas, entretanto com poucos dias de cultivo é possível observar células predominantemente esféricas.

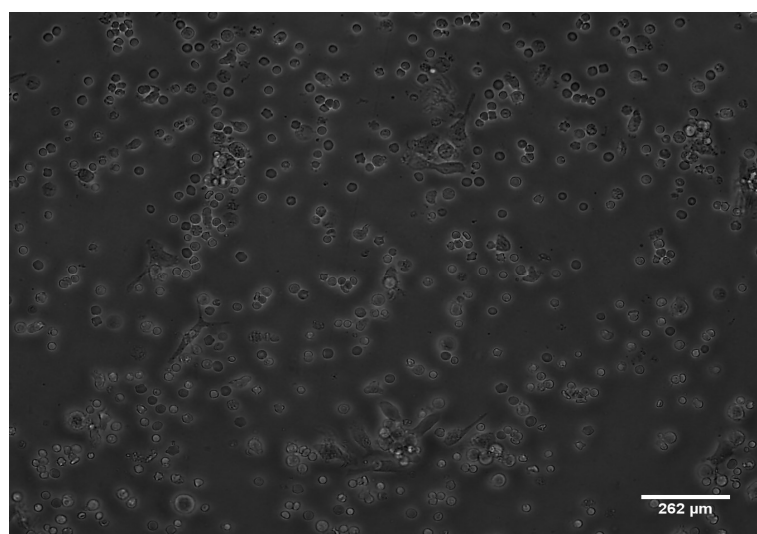


Figura 63 - Micrografia dos osteoblastos após 2 dias de cultivo.
Fonte: Autor.

4.3 Discos hidroxiapatita-alendronato

Preparados alguns discos de hidroxiapatita, foi decidido que os primeiros testes seriam realizados com o biocompósito preparado com hidroxiapatita e alendronato, sem o *Pluronic*[®]. Para incorporar o alendronato na hidroxiapatita, o disco de hidroxiapatita foi incubado durante 24h a 37°C em uma solução aquosa de alendronato. Duas concentrações diferentes foram preparadas, discos contendo 1mg e 0,1mg de alendronato. No primeiro ensaio, um criotubo com os precursores de osteoclastos foi descongelado, cultivado durante um dia e tripsinizado. As células foram contadas e semeadas nas amostras na concentração de 10^5 células por amostra/poço (placa de 48 poços) e para o controle $2 \cdot 10^5$ células/poço foram semeadas em uma placa (48 poços) previamente preparada com um revestimento de fosfato de cálcio. A placa de amostra continha quatro amostras de cada tipo, HA (HA pura), HAAL-1 e HAAL-0,1. O experimento foi encerrado após seis dias de cultivo, nos quais a cada dois dias o meio de cultura (osteoclastogêneses) foi trocado.

O ensaio colorimétrico de *TRAP* foi realizado tanto para as amostras quanto para os controles. A Figura 64 ilustra as micrografias obtidas para os controles. Apesar de se observar a presença de pelo menos um osteoclasto, todas as células se encontram distribuídas entre as rachaduras do revestimento de fosfato de cálcio, comportamento anormal para osteoclastos que deveriam ter mais afinidade ao revestimento do que a placa de plástico.

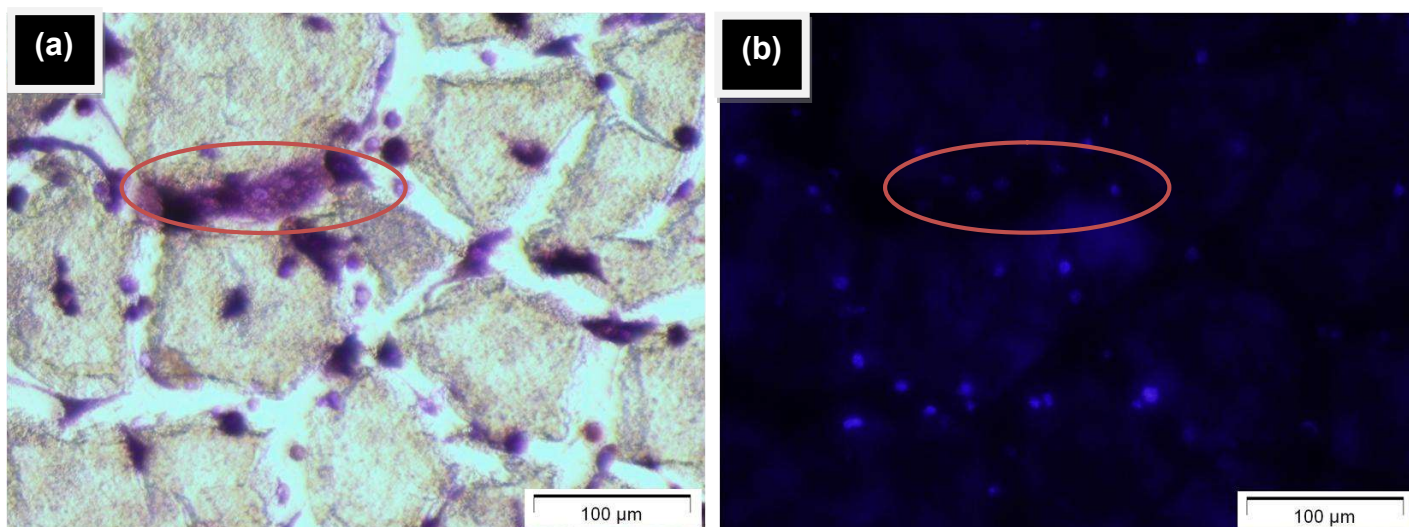


Figura 64 - Micrografias dos osteoclastos (controle placa com revestimento de fosfato de cálcio) (a) coloridos para *TRAP* e (b) com fluorescência *DAPI*.

Fonte: Autor.

Durante a análise das amostras, nenhuma célula foi observada. Esse resultado poderia indicar que o material era tóxico para os osteoclastos ou que o problema poderia estar relacionado com as próprias células, visto o resultado estranho obtido para os controles também.

Assim, primeiramente, a fim de avaliar se o problema era a toxicidade das amostras foi realizado um ensaio de viabilidade celular com *alamar blue*[®]. O ensaio consistiu em incubar as amostras, no caso quatro discos de hidroxiapatita (HA pura), em meio de cultura a 37°C durante 24h. Os meios de cultura foram recolhidos, filtrados e armazenados a 4°C. Fibroblastos de passagem três foram descongelados, cultivados por três dias, tripsinizados e semeados a concentração de 10.000 células/poço em uma placa de 24 poços. Em metade dos poços foi adicionado meio de cultura comum, e na outra o meio de cultura retirado das amostras. Após um dia de incubamento foi realizado o ensaio de *alamar blue*[®]. Para quantificar os fibroblastos foi preparada uma curva de calibração como descrito no tópico 3.6.7.1. O gráfico foi ajustado com uma equação linear (programa Origin) e o R^2 obtido foi de 0,998 (Figura 65).

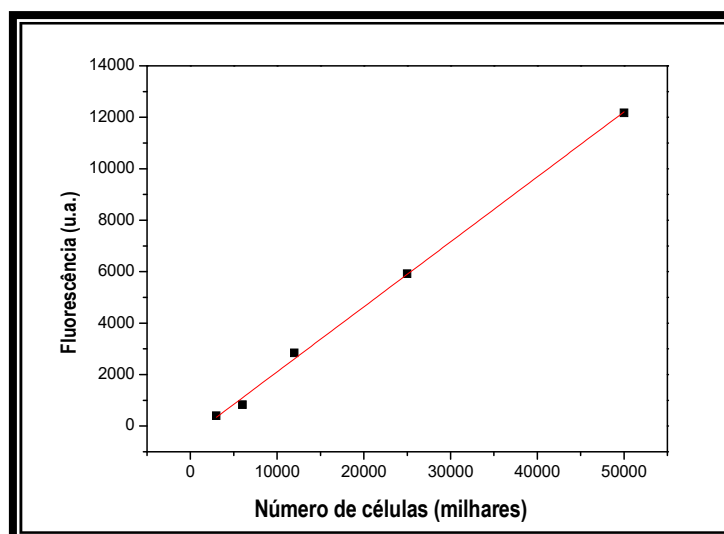


Figura 65 - Curva de calibração *alamar blue*®.
Fonte: Autor.

O gráfico com os resultados do ensaio de viabilidade está ilustrado na Figura 66. Observa-se que, a quantidade de células cultivadas no meio de cultura das amostras é bem menor do que nos controles, por volta de 10.000 células a menos. Entretanto comparando com o que foi semeado inicialmente o número de fibroblastos nas amostras quase dobrou (aumento de 1,8X). O resultado indica que as amostras não devem ser citotóxicas visto que as células continuaram proliferando, mesmo que em menor número do que nos controles.

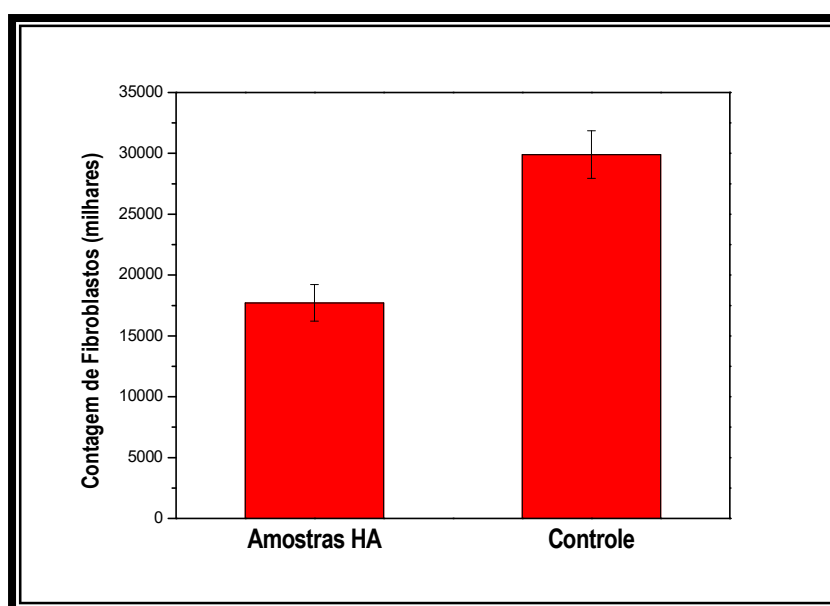


Figura 66 - Resultado da viabilidade celular.
Fonte: Autor.

A morfologia dos fibroblastos também foi analisada por microscopia ótica (Figura 67). Comparando as micrografias dos controles com a das amostras observa-se um número maior de células nos controles, o que corrobora com os resultados obtidos no *alamar blue*[®]. Em relação à morfologia, nos dois casos as células se mostram alongadas, morfologia normal para fibroblastos, e se mostram “saudáveis”, pois quando as células estão morrendo elas passam a ficar mais esféricas. A partir desses resultados, concluiu-se que o que aconteceu nos ensaios com os osteoclastos não estava relacionado às amostras, e sim as próprias células. Acredita-se que o problema foi devido à criopreservação dos precursores de osteoclastos, isto porque as células exibem diferentes tolerâncias a criopreservação. Para contornar esse problema, nos ensaios seguintes os osteoclastos foram semeados nas amostras no mesmo dia do seu isolamento.

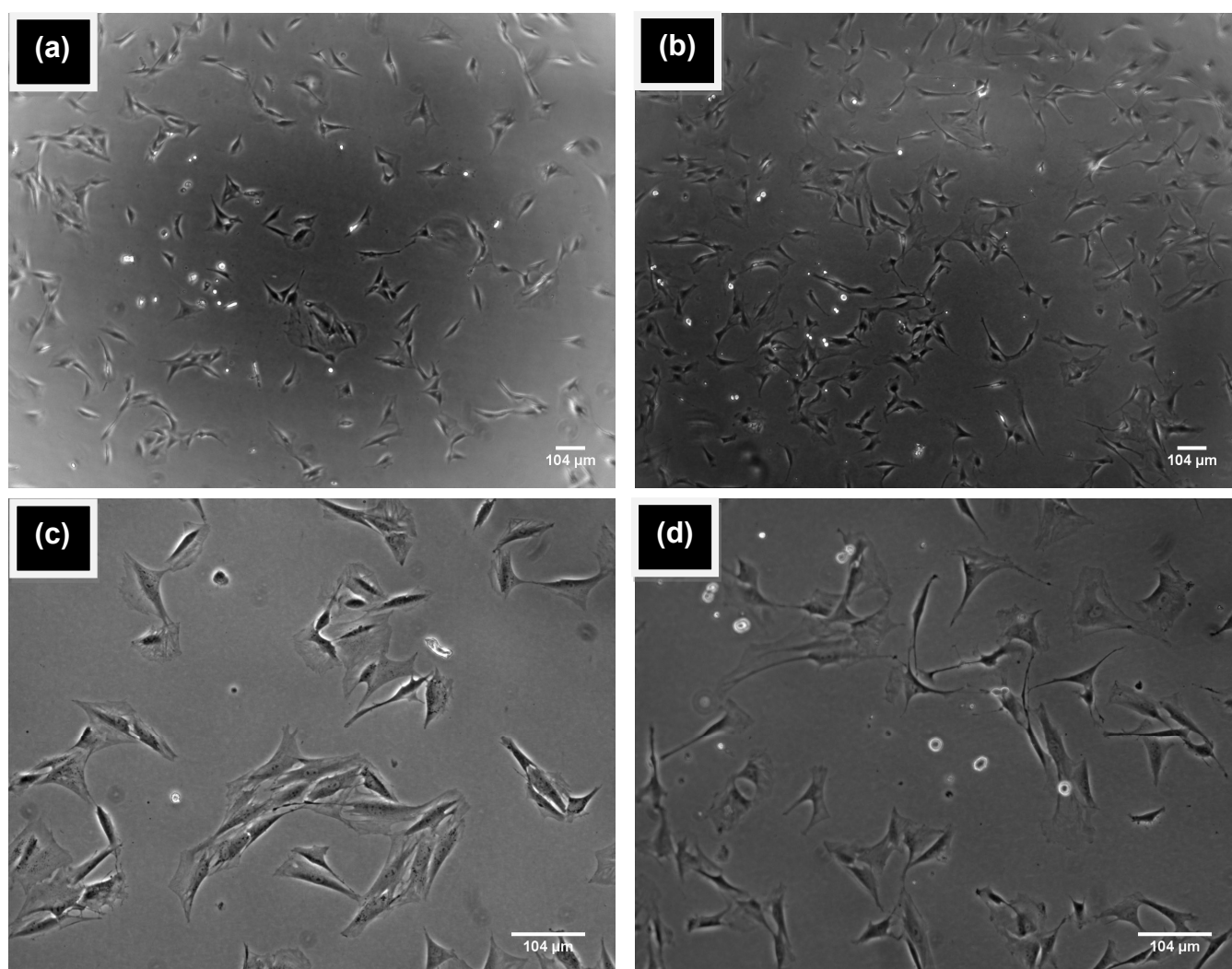


Figura 67 - Micrografias dos fibroblastos (a) e (c) cultivados com o meio de cultura das amostras e (b) e (d) com o meio de cultura normal (controle).

Fonte: Autor.

Devido aos problemas com a criopreservação e descongelamento dos precursores de osteoclastos, antes de semear os osteoblastos nas amostras, estes foram descongelados e cultivados durante 21 dias para observar sua diferenciação. Os osteoblastos foram analisados por vermelho de alizarina e microscopia ótica. A Figura 68 ilustra a fotografia dos osteoblastos coloridos com vermelho de alizarina, após os 21 dias de cultivo, na primeira fileira as células foram cultivadas com meio de cultura osteogênico e na segunda fileira com meio normal. Como era esperado, apenas para as células cultivadas com o meio osteogênico o ensaio foi positivo para a matriz de cálcio. O teste positivo indica que os osteoblastos estão produzindo “novos” ossos, no caso matrizes extracelulares de fosfato de cálcio.

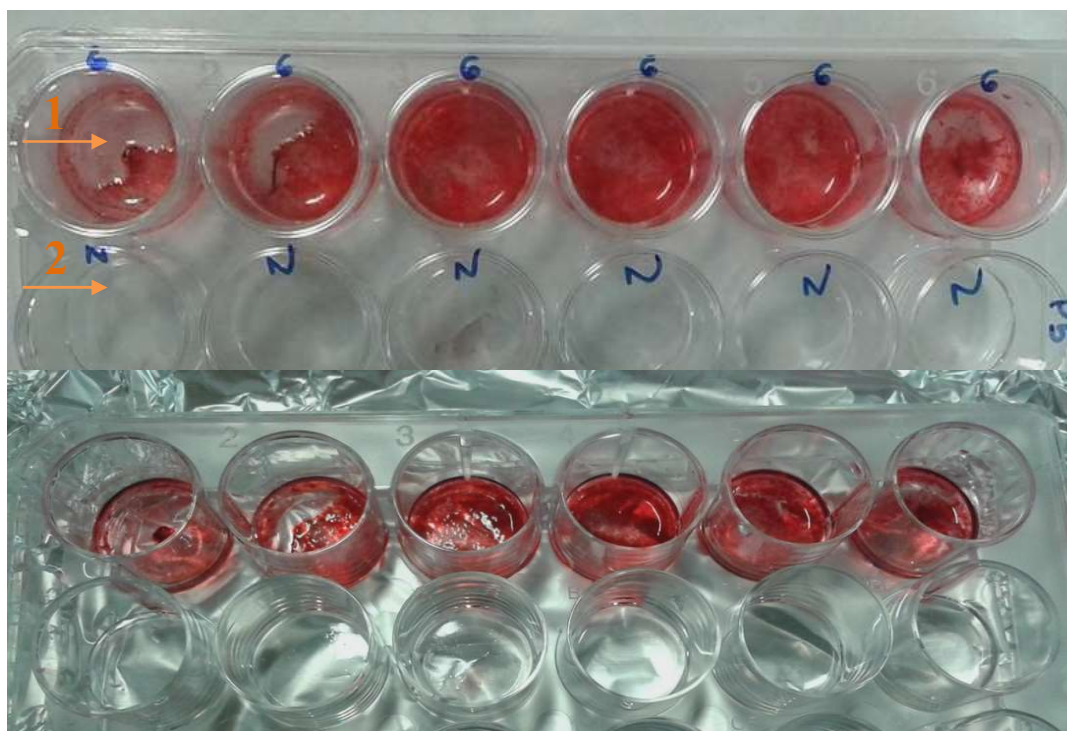


Figura 68 - Fotografia da placa de cultivo dos osteoblastos após o ensaio de vermelho de alizarina.
Fonte: Autor.

A Figura 69 ilustra as micrografias óticas obtidas para os osteoblastos cultivados com o meio de cultura osteogênico. Observa-se uma rede formada por células alongadas (Figura 69 (a)) morfologia característica dos osteoblastos. Na Figura 69 (b) também é possível observar a matriz extracelular produzida pelos osteoblastos.

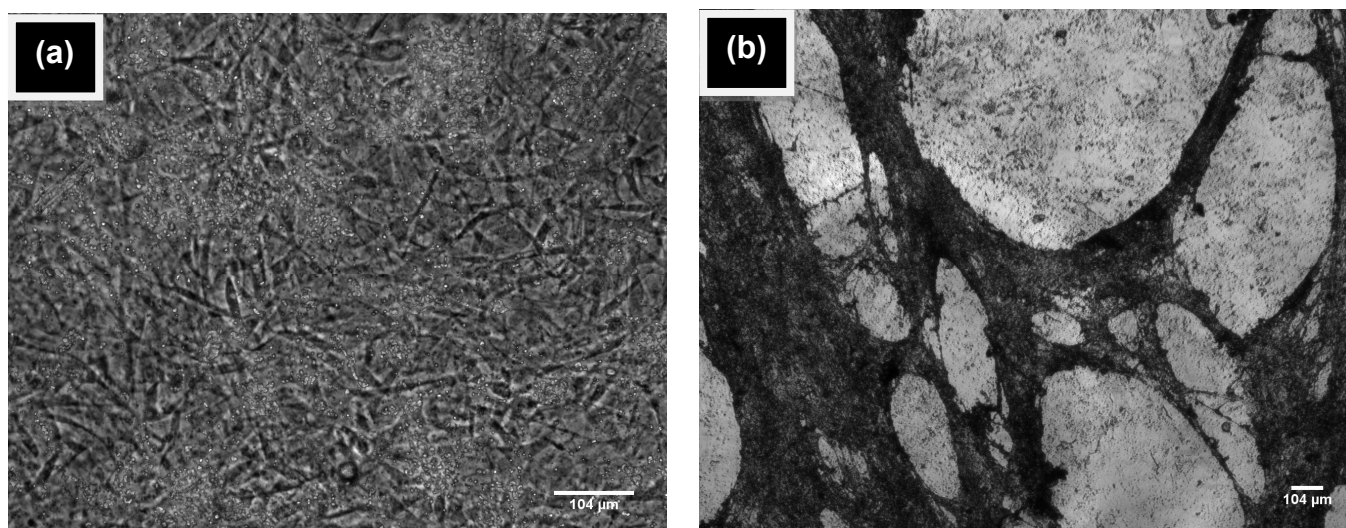


Figura 69 - Micrografias após 21 dias de cultivo no meio osteogênico (a) dos osteoblastos (b) da matriz extracelular.

Fonte: Autor.

Visto os resultados positivos obtidos após o descongelamento e cultivo dos osteoblastos, estes foram semeados na superfície dos discos de HA e HAAL. Após um dia de cultivo com as células, as amostras foram fixadas e coloridas com azul de metileno apenas para observar se as células haviam aderido à superfície das amostras. A fotografia tirada após o ensaio do azul de metileno está ilustrada na Figura 70. O corante deveria apenas colorir as células na superfície, entretanto o disco de hidroxiapatita absorveu o azul de metileno, tornando impossível distinguir a presença das células. Mesmo assim, o restante das amostras continuou a ser cultivado com os osteoblastos durante 21 dias, ao final elas foram fixadas e armazenadas em tampão fosfato a 4°C. Como não foi possível usar o ensaio do azul de metileno e nem do vermelho de alizarina, pois as amostras são compostas de fosfato de cálcio, as amostras foram armazenadas para possíveis análises futuras.

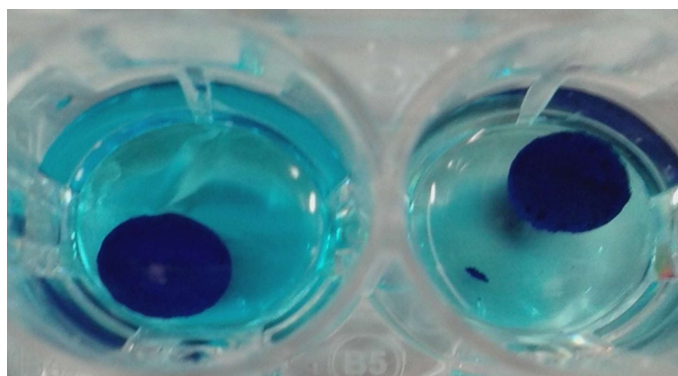


Figura 70 - Fotografia das amostras de hidroxiapatita após um dia de cultivo com as células e coloridas com azul de metileno.

Fonte: Autor.

Após os ensaios com os osteoblastos, foi realizado um segundo isolamento de osteoclastos e os precursores foram semeados nas amostras no mesmo dia. Em cada amostra foi semeado 10^5 células/poço em três tipos diferentes de amostra, HA (HA pura), HAAL-1,0 (1mg) e HAAL-0,1 (0,1mg), além dos controles. Após seis dias de cultivo uma parte das amostras foi fixada e colorida para *TRAP*. A Figura 71 ilustra as micrografias obtidas para a amostra constituída apenas de hidroxiapatita (HA). Observa-se várias células na superfície das amostras. Devido ao tamanho das células e ao aumento do microscópio não foi possível contar e quantificar o número de osteoclastos.

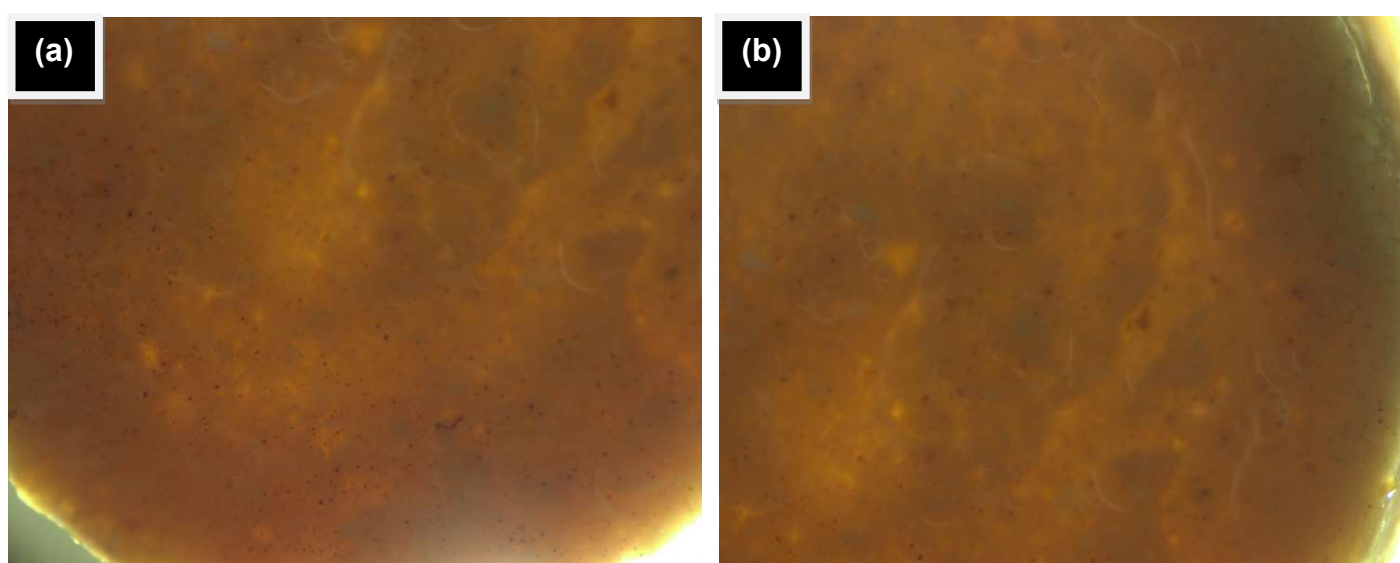


Figura 71 - Micrografias das amostras de hidroxiapatita com as células coloridas para *TRAP*.

Fonte: Autor.

A Figura 72 ilustra as micrografias obtidas para as amostras constituídas de HAAL-0,1 e HAAL-1,0 (a) e (b) respectivamente. Observa-se na amostra de 0,1mg de AL algumas células na superfície e na de 1,0mg quase nenhuma célula. O resultado é coerente, pois o alendronato deveria causar a apoptose dos osteoclastos, sendo assim quanto mais alendronato menos células deveriam sobreviver. Já nas amostras apenas com hidroxiapatita os osteoclastos deveriam “crescer”, no caso se fundir, e reabsorver o material. Existem alguns testes para observar os buracos feitos pelos osteoclastos, entretanto como a amostra é porosa não seria possível distinguir esses buracos. Mas comparando-se a quantidade de células observadas na superfície de cada amostra é claro que na amostra com hidroxiapatita há uma quantidade muito maior do que nas amostras com alendronato.

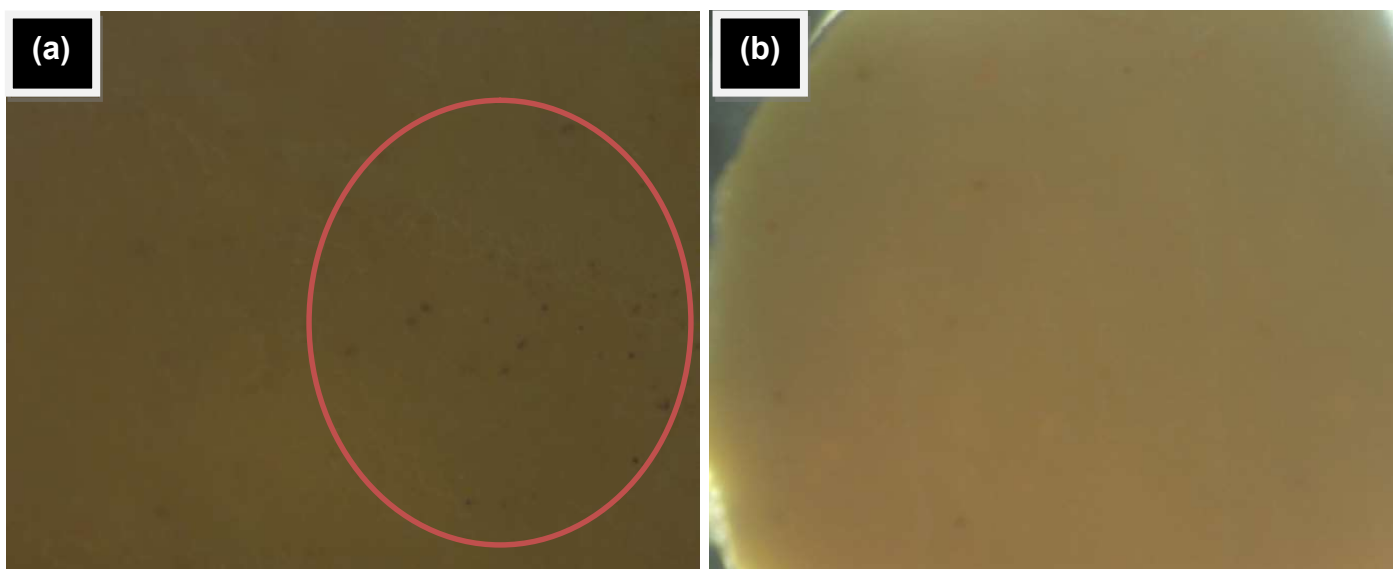


Figura 72 - Micrografias das amostras com as células coloridas para *TRAP* (a) HAAL-0,1 e (b) HAAL1,0.

Fonte: Autor.

O ensaio de viabilidade celular também foi realizado nas amostras após sete dias de cultivo. Devido à quantidade de células isoladas não foi possível realizar uma curva padrão para os osteoclastos, por isso o resultado é comparativo. A Figura 73 ilustra o gráfico com os resultados obtidos para o *alamar blue*[®], a fluorescência é proporcional a quantidade de células presentes, assim observa-se que a amostra de HA possui aproximadamente 10X mais osteoclastos que as amostras com alendronato. Entre as amostras com diferentes concentrações alendronato a quantidade não varia tanto. Esse resultado corrobora com o que foi observado no ensaio de colorimetria *TRAP*.

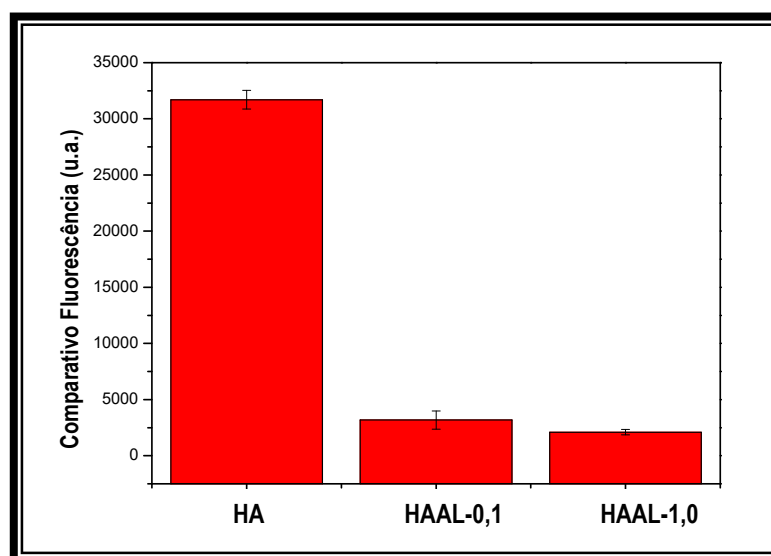


Figura 73 - Resultado da viabilidade celular dos osteoclastos.

Fonte: Autor.

4.4 Biocompósito Gel Alginato-*Pluronic*[®] e disco hidroxiapatita

Os ensaios *in vitro* realizados com os discos de hidroxiapatita mostraram bons resultados, entretanto a idéia do projeto era utilizar o copolímero *Pluronic*[®] para realizar a liberação de alendronato. O *Pluronic*[®] é um copolímero termosensível que pode ser usado como gel, por exemplo, o *Pluronic*[®] F127 em soluções aquosas pode se comportar como uma solução de baixa viscosidade a baixas temperaturas ou formar uma estrutura cúbica líquida cristalina que se comporta mecanicamente como um gel em temperaturas maiores (183). Para aumentar a resistência mecânica do gel e conseqüentemente a taxa de liberação do fármaco a ideia foi usar uma mistura do *Pluronic*[®] F127 com alginato. O alginato é um polímero natural, biocompatível, de baixa toxicidade que com a adição de cátions divalentes, como o Ca^{+2} , sofre reticulação produzindo gels com alta força mecânica (164). Assim a camada rígida de alginato ficaria em contato com o meio de cultura prevenindo uma rápida erosão do gel e a camada mole do *Pluronic*[®] interagiria com o alendronato.

Como primeiro teste, células mesenquimais foram semeadas nas amostras a fim de avaliar se estas adeririam à sua superfície. A concentração de 10^5 células/poço foi semeada por amostra, nesse primeiro ensaio foram utilizadas apenas amostras com gel e hidroxiapatita (HAGEL), sem adicionar o alendronato. A Figura 74 ilustra as micrografias de fluorescência obtidas para as amostras com faloidina. Apesar das células se encontrarem mais para a borda do material, e não em seu centro, observa-se uma boa quantidade de células aderidas na superfície.

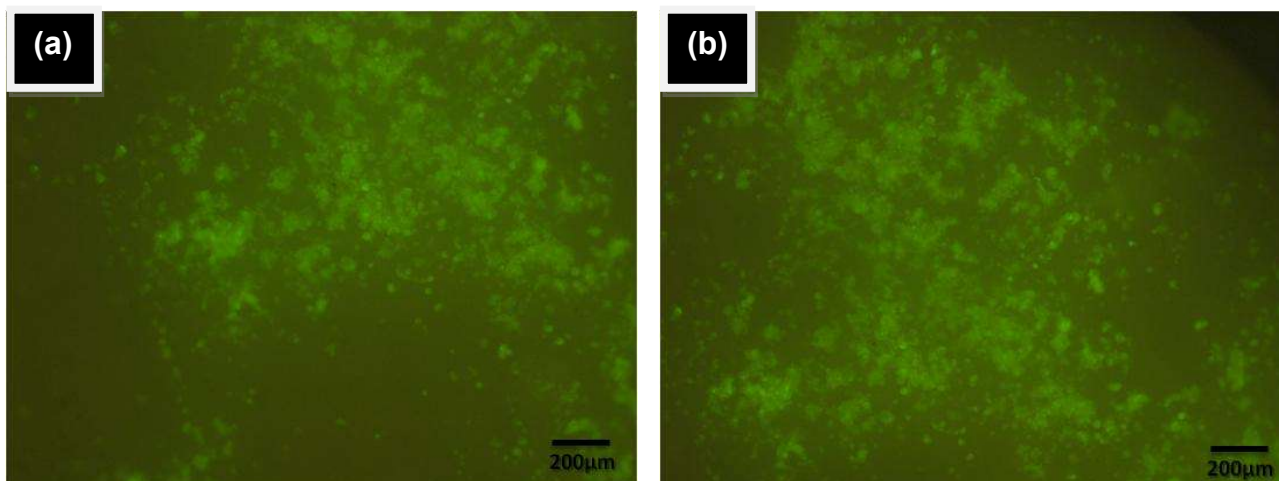


Figura 74 - Micrografias de fluorescência dos biocompósitos HAGEM com faloidina (a) e (b).
Fonte: Autor.

Considerando o bom resultado com as células mesenquimais, foram realizados testes com os osteoclastos. Dessa vez, os osteoclastos foram isolados da calvária de ratos recém-nascidos. Nesse tipo de isolamento não são obtidos precursores de osteoclastos e sim osteoclastos em si, não sendo necessário o cultivo por sete dias para realizar a osteoclastogênese. Junto com os osteoclastos também acabaram sendo isolados fibroblastos, como não é possível separá-los o ensaio foi realizado nessa co-cultura. Foram preparados dois tipos de amostras, um biocompósito formado por gel e hidroxiapatita e outro gel com 0,1mg de AL e hidroxiapatita. Durante o procedimento não foi possível realizar a contagem das células por isso se tomou cuidado de semear o mesmo volume e assim a mesma concentração de células nas amostras e nos controles. O cultivo se deu durante seis dias antes das células serem fixadas.

A Figura 75 ilustra micrografias de fluorescência obtidas para os controles após os seis dias de cultivo com DAPI e faloidina. Observa-se uma rede de células formadas pelos fibroblastos e os osteoclastos no meio delas, muitos osteoclastos se encontravam embaixo dessa rede não sendo possível obter imagem deles. Entretanto o objetivo dessa análise era apenas observar se as células corretas haviam sido isoladas e foi possível obter um bom número de osteoclastos.

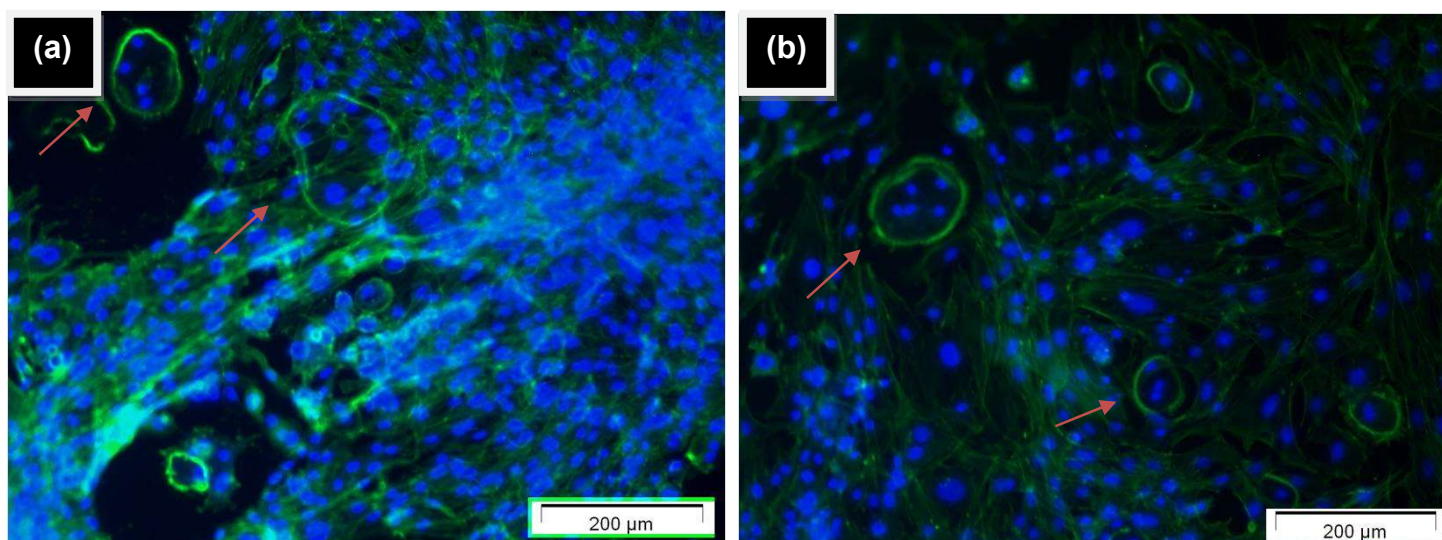


Figura 75 - Micrografias de fluorescência dos controles com faloidina e DAPI após seis dias de cultivo com co-cultura fibroblastos/osteoclastos (a) e (b).

Fonte: Autor.

As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (*TRAP*). A Figura 76 ilustra as micrografias eletrônicas de varredura da amostra HAGEL. Observam-se células aderidas na superfície da amostra porosa, entretanto a morfologia dessas células é característica dos fibroblastos, nenhum osteoclasto foi observado.

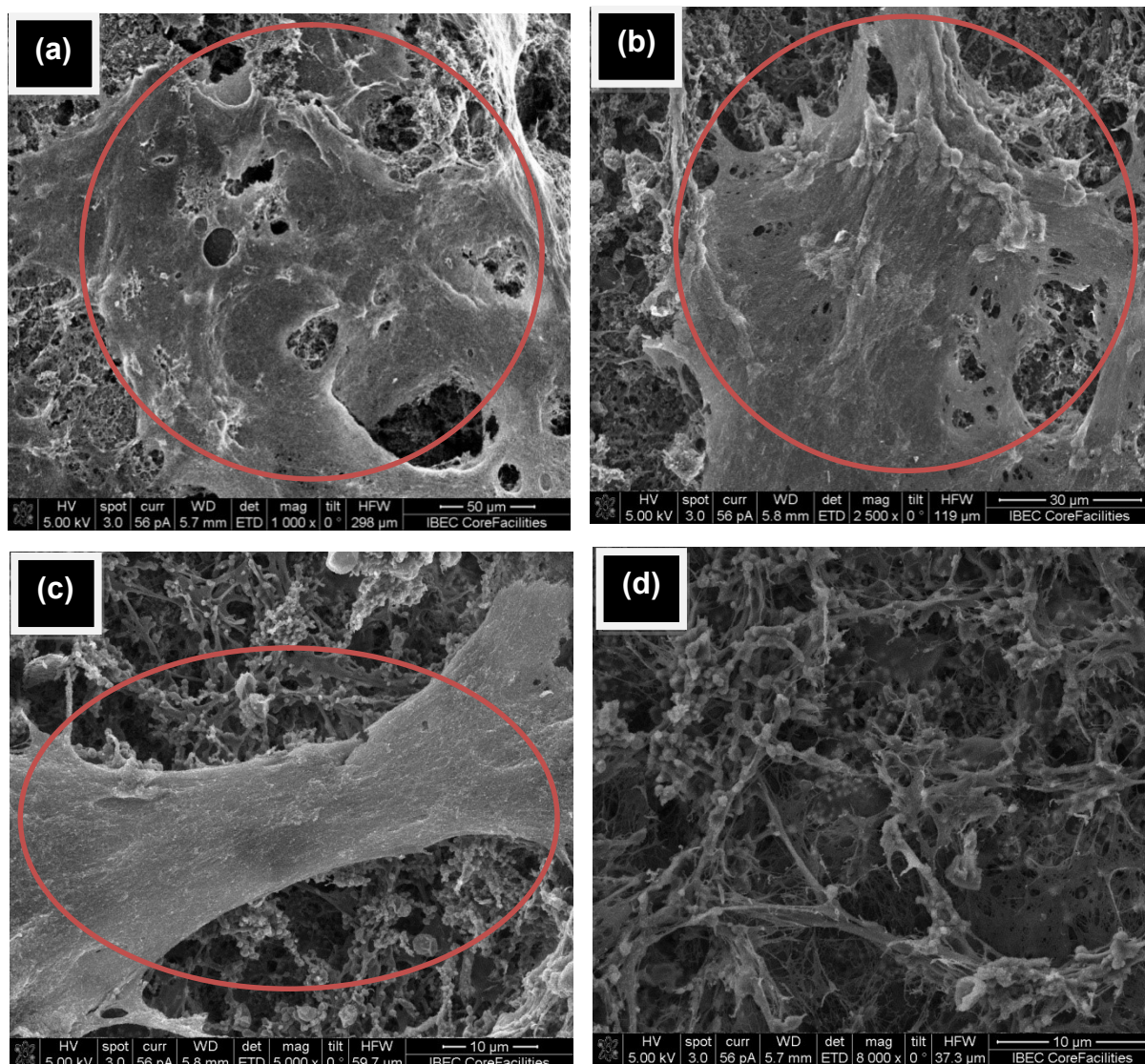


Figura 76 - Micrografias eletrônicas de varredura dos biocompósitos HAGEL após 6 dias de cultivo com co-cultura fibroblastos/osteoclastos (a),(b),(c) e (d).

Fonte: Autor.

Para as amostras de HAGELAL, observou-se nas micrografias eletrônicas de varredura (Figura 77) que as células não se encontravam tanto na superfície do material e sim interiorizadas, entre os poros do material. Da mesma maneira que nas outras amostras não foi possível observar osteoclastos, somente fibroblastos.

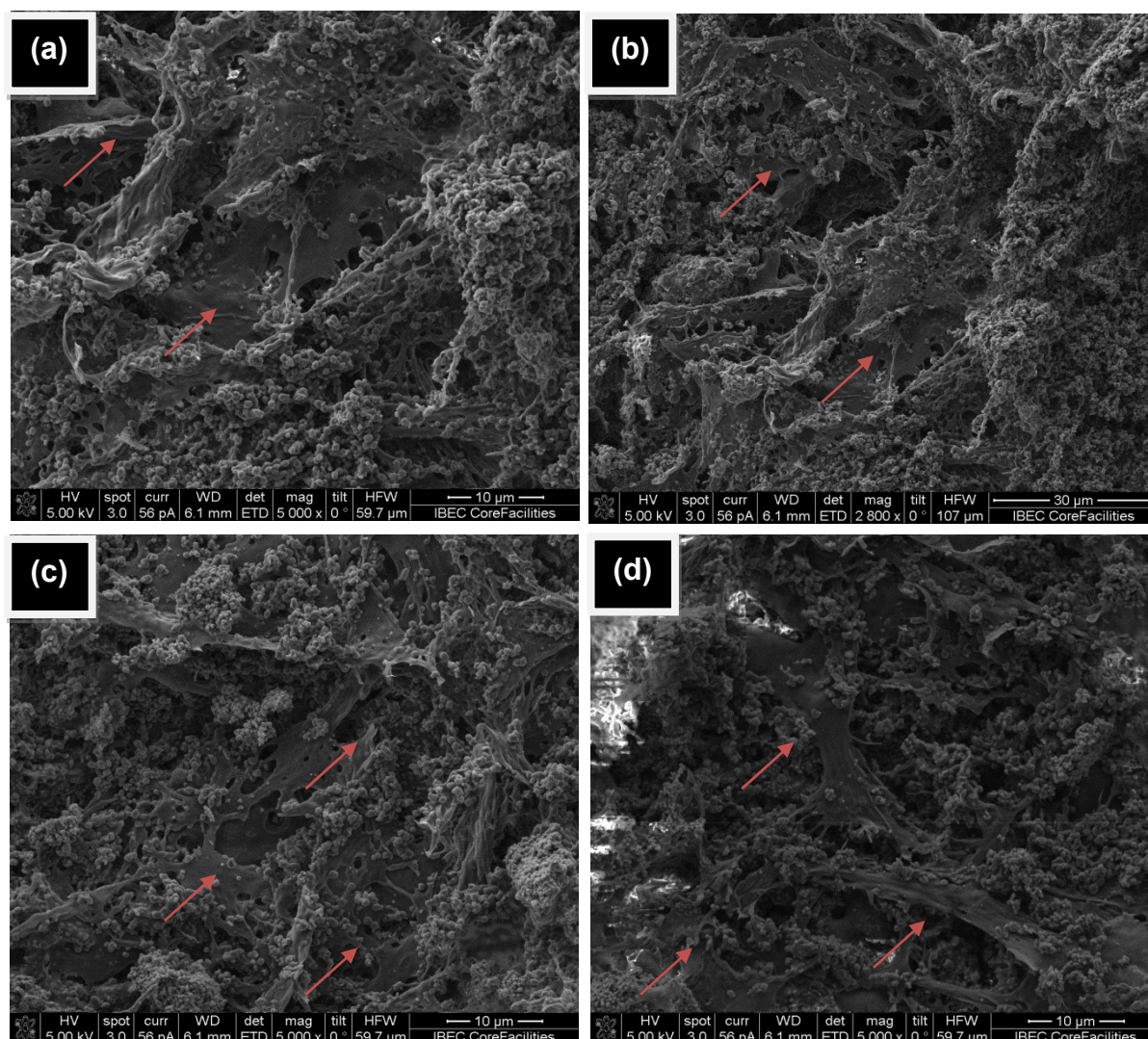


Figura 77 - Micrografias eletrônicas de varredura dos biocompósitos HAGELAL após seis dias de cultivo com co-cultura fibroblastos/osteoclastos (a), (b), (c) e (d).

Fonte: Autor.

O resultado para atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente está ilustrado na Figura 78. O gráfico está em modo comparativo de absorvância, no geral os dois biocompósitos tanto com alendronato quanto sem mostraram resultados semelhantes. O controle indicou uma quantidade maior de osteoclastos, considerando que a quantidade de osteoclastos estaria diretamente relacionada com sua atividade. O resultado está de acordo com o que foi observado na microscopia de varredura, onde não foi possível observar nenhum osteoclasto nos biocompósitos, apenas fibroblastos. A presença dos fibroblastos indica que as amostras não apresentam problemas de toxicidade, mas não foi possível concluir o problema com os osteoclastos. Esse experimento foi um dos últimos realizados, por

isso não houve tempo suficiente para tentar isolar apenas osteoclastos e realizar o ensaio novamente.

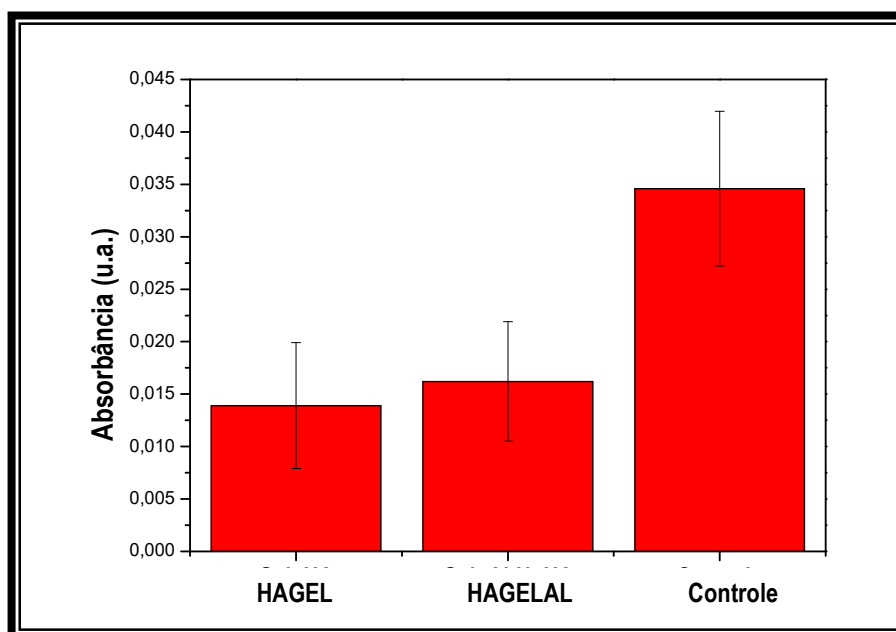


Figura 78 - Resultado da atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente.
Fonte: Autor.

O último teste realizado foi o da atividade da fosfatase alcalina com as células mesenquimais. A ideia era observar se as amostras induziriam as células mesenquimais a se diferenciar em osteoblastos. No geral são necessários vinte e um dias de cultura, entretanto o teste foi realizado em 16 dias. A Figura 79 ilustra a curva de calibração obtida para poder quantificar a fosfatase alcalina. O gráfico foi ajustado com uma equação linear (programa Origin) e o R^2 obtido foi de 0,963.

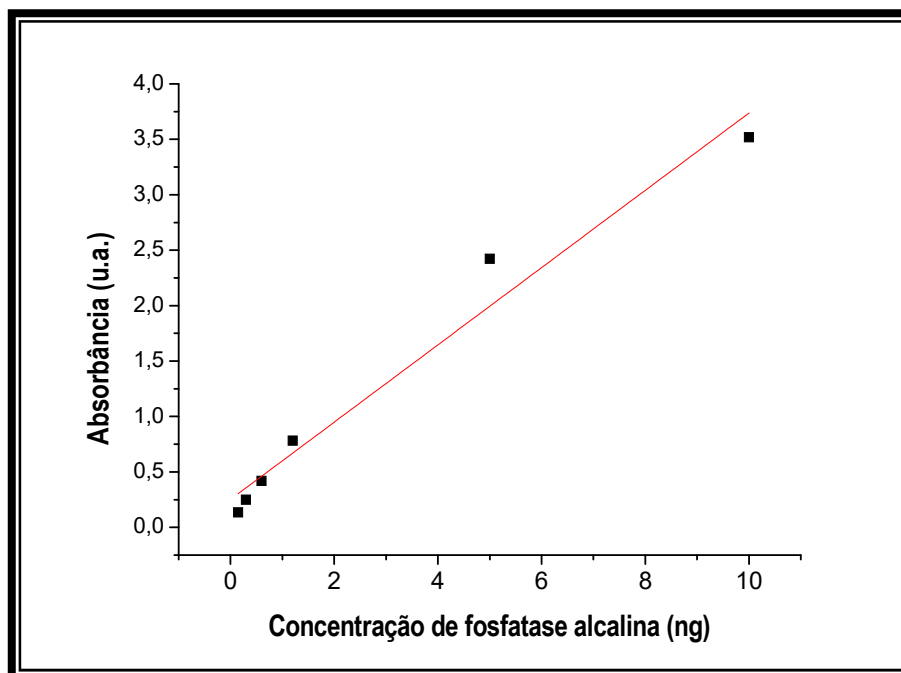


Figura 79 - Curva de calibração ALP.
Fonte: Autor.

O resultado para as amostras e controles está ilustrado na Tabela 21. É interessante observar que mesmo antes de completar vinte e um dias, o bicomposto com alendronato indica atividade da fosfatase alcalina, entre oito e dezesseis dias o valor aumenta mais de 10X. O bicomposto apenas com hidroxiapatita começa a apresentar atividade após dezesseis dias de cultivo, mas com um valor muito menor se comparado ao bicomposto com alendronato. Esses resultados indicam que o material poderia estar induzindo a formação de osteoblastos, principalmente o bicomposto com alendronato. Mais ensaios seriam necessários para realmente comprovar essa indução, entretanto esse resultado é um indicio muito bom do potencial do bicomposto, o qual além de inibir os osteoclastos apresentou uma atividade de indução de osteoblastos.

Tabela 21 - Resultados atividade da fosfatase alcalina.

	Atividade da fosfatase alcalina (ng)		
	HAGEL	HAGELAL	Controle
Dia 3	0	0	0
Dia 8	0	0,047	0
Dia 16	0,052	0,435	0

Fonte: Autor.

5. CONCLUSÕES

Foi possível isolar osteoblastos da calvária de ratos adultos e caracterizá-los com sucesso por meio do ensaio do vermelho de alizarina. Os osteoblastos restantes foram descongelados e semeados nos biocompósitos HA e HAAL, entretanto não foi possível analisar os resultados, pois a hidroxiapatita absorvia o corante azul de metileno utilizado no ensaio.

Foi possível isolar osteoclastos da tíbia de ratos adultos e da calvária de ratos recém-nascidos, no último caso, entretanto era isolada uma co-cultura de fibroblastos e osteoclastos. Os osteoclastos foram semeados nas amostras HA, HAAL-0,1 e HAAL-1,0. Os resultados obtidos dos ensaios de *TRAP* e *alamar blue*[®] indicaram maior presença de osteoclastos nas amostras com hidroxiapatita e menor nas amostras com maior concentração de alendronato. A co-cultura de fibroblastos e osteoclastos foi semeada nas amostras HAGEL e HAGELAL, as análises de microscopia eletrônica de varredura indicaram que quase não haviam osteoclastos em nenhum tipo de amostra, entretanto observou-se a presença dos fibroblastos nas duas amostras.

Uma última análise realizada nos biocompósitos (HAGEL e HAGELAL) da atividade da fosfatase alcalina com células mesenquimais indicou que as amostras poderiam estar induzindo a diferenciação das células em osteoblastos, principalmente a amostra com HAGELAL que possui alendronato.

Os resultados obtidos sugerem que o biocompósito desenvolvido neste trabalho, além de inibir a ação de osteoclasto, estimulou a formação de osteoblastos. Este comportamento indica o potencial do material desenvolvido para aplicações em regeneração óssea de pessoas com osteoporose.

Referências

- 1 ELIAZ, N. ; METOKI, N. Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. **Materials**, v. 10, n. 4, p. 334/1-334/104, 2017.
- 2 SHAVANDI, A. et al. A review of synthesis methods, properties and use of hydroxyapatite as a substitute of bone. **Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering**, v. 25, p. 98-117, 2015.
- 3 HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 362, n. 1825, p. 2821-2850, 2004.
- 4 SHEA, J. E.; MILLER, S. C. Skeletal function and structure: Implications for tissue-targeted therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 7, p. 945-957, 2005.
- 5 FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015. doi:10.1155/2015/421746.
- 6 TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, 2000.
- 7 LINDSAY, R. et al. Consensus development statement: who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 1997.
- 8 HUANG, Q. et al. Ophiopogonin D: a new herbal agent against osteoporosis. **Bone**, v. 74, p. 18-28, 2015.
- 9 REYNOLDS, J. E. F. (Ed). **Martindale: the extra pharmacopeia**. 31st ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. 2739 p.
- 10 MELTON, L. J. et al. Perspective how many women have osteoporosis? **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 9, p. 1005-1010, 1992.
- 11 MELTON, L. J. et al. Bone density and fracture risk in men. **Journal of Bone and Mineral Research: the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 12, p. 1915-1923, 1998.
- 12 KANIS, J. A. et al. Osteoporosis international position paper guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 7, p. 390-406, 1997.

- 13 HERNLUND, E. et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden: a report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). **Archives of Osteoporosis**, v. 8, n. 1/2, p. 1-115, 2013.
- 14 SIQUEIRA, F. V.; FACCHINI, L. A.; HALLAL, P. C. The burden of fractures in brazil: a population-based study. **Bone**, v. 37, n. 2, p. 261-266, 2005.
- 15 MARINHO, B. C. G. et al. The burden of osteoporosis in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 434-443, 2014.
- 16 ARAÚJO, D. V.; OLIVEIRA, J. H. A.; BRACCO, O. L. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no sistema suplementar de saúde brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, p. 897-901, 2005.
- 17 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.
- 18 SOPYAN, I. et al. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 8, n. 1/2, p. 116-123, 2007.
- 19 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.
- 20 KABANOV, A.; BATRAKOVA, E.; ALAKHOV, V. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 189-212, 2002.
- 21 GIGER, E. V.; CASTAGNER, B.; LEROUX, J. C. Biomedical applications of bisphosphonates. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 2, p. 175-188, 2013.
- 22 GUO, Y. P. et al. Fabrication of mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres by hydrothermal method. **Materials Letters**, v. 65, n. 14, p. 2205-2208, 2011.
- 23 GREENWALD, A. S. et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 83, n. 2, p. S98-S103, 2001. Supplement 2.
- 24 ROGERS, G.; GREENE, A. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 23, n. 1, p. 323-327, 2012.
- 25 GOULET, J. A. et al. Autogenous Iliac crest bone graft: complications and functional assessment. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 339, p. 76-81, 1997.

- 26 NEELAKANDESWARI, N.; SANGAMI, G.; DHARMARAJ, N. Preparation and characterization of nanostructured hydroxyapatite using a biomaterial. **Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 513-516, 2011.
- 27 JENSEN, S. S. et al. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 3, p. 237-243, 2006.
- 28 DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate coatings, films and layers. **Progress in Biomaterials**, v. 1, n. 1, p. 1-40, 2012.
- 29 LI, X. et al. The use of nanoscaled fibers or tubes to improve biocompatibility and bioactivity of biomedical materials. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013. doi:10.1155/2013/728130.
- 30 van der ELST, M. et al. Tissue reaction on PLLA versus stainless steel interlocking nails for fracture fixation: an animal study. **Biomaterials**, v. 16, n. 2, p. 103-106, 1995.
- 31 TODO, M. et al. Relationship between microstructure and fracture behavior of bioabsorbable HA/PLLA composites. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 37, n. 12, p. 2221-2225, 2006.
- 32 KANE, R.; MA, P.X. Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. **Materials Today**, v. 16, n. 11, p. 418-423, 2013.
- 33 MBUYI-MUAMBA, J. M.; DEQUEKER, J.; GEVERS, G. Biochemistry of bone. **Bailliere's Clinical Rheumatology**, v. 2, n. 1, p. 63-101, 1988.
- 34 LEE, C. A.; EINHORN, T. A. The bone organ system: form and function. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D. (Ed.). **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 2001. Chap 1, p. 3-20.
- 35 HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p. 1705-1728, 1998.
- 36 HULBERT, S. F. et al. History of bioceramics. **Ceramics International**, v. 8, n. 4, p. 131-140, 1982.
- 37 GALLETTI, P. M.; BORETOS, J. W. Report on the Consensus-Development Conference on "Clinical Applications of Biomaterials," 1-3 November 1983. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 17, n. 3, p. 539-555, 1983.
- 38 PELTIER, L. F. et al. The use of plaster of paris to fill defects in bone. **Annals of Surgery**, v. 146, n. 1, p. 61-69, 1957.

- 39 KAWACHI, E. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.
- 40 VALLET-REGÍ, M. Bioceramics. In: VALLET-REGÍ, M. (Ed.). **Bio-ceramics with clinical applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2014. Chap.1, p. 4-16.
- 41 VALLET-REGÍ, M. Introduction to the world of biomaterials. **Anales de Química**, v. 93, n. 1, p. s16-s14, 1997.
- 42 AOKI, H. Hydroxyapatite of great promise for biomaterials. **Transactions of JWRI**, v. 17, n. 1, p. 107-112, 1988.
- 43 HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- 44 DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. **Materials**, v. 2, n. 2, p. 399-498, 2009.
- 45 DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, v. 20, p. 2287-2303, 1999.
- 46 HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014-1017, 2002.
- 47 ARCOS, D. Calcium phosphate bioceramics. In: VALLET-REGÍ, M. (Ed.). **Bio-ceramics with clinical applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2014. Chap. 3, p. 23-71.
- 48 HUANG, J., BEST, S. Ceramic biomaterials for tissue engineering. In: BOCCACCINI, A. R.; MA, P. X. (Ed.). **Tissue engineering using ceramics and polymers**. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. Chap. 1, p. 3-34.
- 49 JILLAVENKATESA, A.; CONDRATE, R. A. Sol-gel processing of hydroxyapatite. **Journal of Materials Science**, v. 33, n. 16, p. 4111-4119, 1998.
- 50 ELLIOTT, J. C.; MACKIE, P. E.; YOUNG, R. A. Monoclinic hydroxyapatite. **Science**, v. 180, n. 12, p. 1055-1057, 1973.
- 51 KIM, J. Y. et al. Powder diffraction studies of synthetic calcium and lead apatites. **Australian Journal of Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 679-686, 2000.
- 52 RANGAVITTAL, N. et al. Structural study and stability of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate: two important bioceramics. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 4, p. 660-668, 2000.
- 53 COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, p. 29-38, 2009.
- 54 KAY, M. I.; YOUNG, R. A.; POSNER, A. S. Crystal structure of hydroxyapatite. **Nature**, v. 204, p. 1050-1052, 1964.

- 55 HOROWITZ, E.; PARR, J. E. **Characterization and performance of calcium phosphate coatings for implants**. Philadelphia: ASTM International, 1994. 212 p.
- 56 PARK, J. **Bioceramics**. New York: Springer New York, 2009. 363 p.
- 57 WANG, C. et al. Phenotypic expression of bone-related genes in osteoblasts grown on calcium phosphate ceramics with different phase compositions. **Biomaterials**, v. 25, n. 13, p. 2507-2514, 2004.
- 58 CHANG, Y. L.; STANFORD, C. M.; KELLER, J. C. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 2, p. 270-278, 2000.
- 59 CAMPRASSE, S. et al. Artificial dental root made of natural calcium carbonate (bioceramics). **Clinical Materials**, v. 5, n. 2/4, p. 235-250, 1990.
- 60 KAPLAN, D. L. Mollusc shell structures: novel design strategies for synthetic materials. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 3, n. 3, p. 232-236, 1998.
- 61 SILVIO, L. D.; DALBY, M. J.; BONFIELD, W. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. **Biomaterials**, v. 23, n. 1, p. 101-107, 2002.
- 62 KHAN, A. F. Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 245-252, 2014.
- 63 HING, K. et al. Influence of phase purity on the in vivo response to hydroxyapatite. **Key Engineering Materials**, v. 195, p. 373-376, 2000.
- 64 JARUDILOKKUL, S.; TANTHAPANICHAKOON, W.; BOONAMNUAYVITTAYA, V. Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles using an emulsion liquid membrane system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 296, n. 1/3, p. 149-153, 2007.
- 65 BOSE, S.; SAHA, S. K. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanopowders by emulsion technique. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 23, p. 4464-4469, 2003.
- 66 PHILLIPS, M. J. et al. Synthesis and characterization of nano-biomaterials with potential osteological applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 10, p. 875-882, 2003.
- 67 RIHN, J. A. et al. The use of bone morphogenetic protein in lumbar spine surgery. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 90, n. 9, p. 2014-2025, 2008.

68 VERRON, E.; BOULER, J. M.; GUICHEUX, J. Controlling the biological function of calcium phosphate bone substitutes with drugs. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 10, p. 3541-3551, 2012.

69 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.

70 SOPYAN, I. et al. Porous hydroxyapatite-gelatin composites with functions of bone substitutes and drug releasing agents: a preliminary study. In: NICOLAU, D. V. (Ed.). **BioMEMS and nanotechnology, II**. Bellingham: SPIE, 2006. p. 60360C/1-60360C/11. (Proceedings of SPIE, v. 6036).

71 TIAN, J.; TIAN, J. Preparation of porous hydroxyapatite. **Journal of Materials Science**, v. 36, n. 12, p. 3061-3066, 2001.

72 TAMPIERI, A. et al. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1365-1370, 2001.

73 AOKI, S. et al. Preparation of porous calcium phosphates using a ceramic foaming technique combined with a hydrothermal treatment and the cell response with incorporation of osteoblast-like cells. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 112, n. 1304, p. 193-199, 2004.

74 TAMAI, N. et al. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 1, p. 110-117, 2002.

75 STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 69, n. 1, p. 62-69, 1968.

76 KAMALY, N. et al. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2971-3010, 2012.

77 ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 170-183, 2011.

78 PITTO-BARRY, A.; BARRY, N. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 3291-3297, 2014.

79 ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, A. T. Poly(ethylene oxide) poly(propylene oxide) poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, n. 1/2, p. 1-46, 1995.

80 SCHMOLKA, I. R. A review of block polymer surfactants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 54, n. 3, p. 110-116, 1977.

- 81 DesNOYER, J. R.; McHUGH, A. J. The effect of pluronic on the protein release kinetics of an injectable drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 86, n. 1, p. 15-24, 2003.
- 82 ALIABADI, H. M.; BROCKS, D. R.; LAVASANIFAR, A. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of cyclosporine A: pharmacokinetics and biodistribution. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7251-7259, 2005.
- 83 CHEN, Y. et al. Enhancing the bioavailability of ABT-963 using solid dispersion containing pluronic F-68. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 286, n. 1/2, p. 69-80, 2004.
- 84 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.
- 85 MILNER, R. J. et al. Bisphosphonates and cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 5, p. 597-604, 2004.
- 86 NANCOLLAS, G. H. et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. **Bone**, v. 38, n. 5, p. 617-627, 2006.
- 87 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.
- 88 FLEISCH, H. Development of bisphosphonates. **Breast Cancer Research: BCR**, v. 4, n. 1, p. 30-34, 2002.
- 89 PETROIANU, G. A. Pharmacist Theodor Salzer (1833-1900) and the discovery of bisphosphonates. **Pharmazie**, v. 66, n. 10, p. 804-807, 2011.
- 90 FLEISCH, H.; BISAZ, S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. **American Journal of Physiology**, v. 203, p. 671-675, 1962.
- 91 FLEISCH, H.; RUSSELL, R. G. G.; STRAUMANN, F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. **Nature**, v. 212, n. 5065, p. 901-903, 1966.
- 92 HOAGLAND, M. B. et al. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 231, n. 1, p. 241-257, 1958.
- 93 FLEISCH, H. et al. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and in vivo. **Calcified Tissue Research**, v. 2, p. 10, 1968. Supplement 1.
- 94 FRANCIS, M. D. et al. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. **Science**, v. 165, n. 3899, p. 1264-1266, 1969.

95 FLEISCH, H. et al. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. **Science**, v. 165, n. 3899, p. 1262-1264, 1969.

96 FRANCIS, M. D.; VALENT, D. J. Historical perspectives on the clinical development of bisphosphonates in the treatment of bone diseases. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 7, n. 1, p. 2-8, 2007.

97 BASSETT, C. A. et al. Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. **Lancet**, v. 2, n. 7625, p. 845-846, 1969.

98 CREMERS, S. C. L. M.; PILLAI, G.; PAPAPOULOS, S. E. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 6, p. 551-570, 2005.

99 RUSSELL, R. G. G. et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1117, p. 209-257, 2007.

100 RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: from bench to bedside. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1068, n. 1, p. 367-401, 2006.

101 THOMPSON, K. J. et al. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 5, p. 1624-1632, 2006.

102 LEHENKARI, P. P. et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 1255-1262, 2002.

103 BEEK, E. V. et al. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 264, n. 1, p. 108-111, 1999.

104 DUNFORD, J. E. et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 2, p. 235-242, 2001.

105 LUCKMAN, S. P. et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including ras. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 4, p. 581-589, 1998.

106 MARAKA, S.; KENNEL, K. A. Bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis. **BMJ Clinical Research**, v. 351, p. h3783/1- h3783/13, 2015.

107 HUYNH, C. T.; LEE, D. S. Controlled release. In: KOBAYASHI, S.; MÜLLEN, K. (Ed.). **Encyclopedia of polymeric nanomaterials**. Berlin: Springer, 2015. p. 1-12.

- 108 YEBRA, D. M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings (Review). **Progress in Organic Coatings**, v. 50, n. 2, p. 75-104, 2004.
- 109 SHAVIV, A.; MIKKELSEN, R. L. Controlled-release fertilizers to increase efficiency of nutrient use and minimize environmental degradation - a review. **Fertilizer Research**, v. 35, n. 1/2, p. 1-12, 1993.
- 110 SHAIK, M. R.; KORSAPATI, M.; PANATI, D. Polymers in controlled drug delivery systems. **International Journal of Pharma Sciences**, v. 2, n. 4, p. 112-116, 2012.
- 111 UHRICH, K. E. et al. Polymeric systems for controlled drug release. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181-3198, 1999.
- 112 ACHARYA, G.; PARK, K. Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 3, p. 387-401, 2006.
- 113 PANDIT, J.; SINGH, S. MUTHU, M. S. Controlled release formulations in neurology practice. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 9, n. 4, p. 207-216, 2006.
- 114 NGUYEN, K.; DANG, P. N.; ALSBERG, E. Functionalized, biodegradable hydrogels for control over sustained and localized siRNA delivery to incorporated and surrounding cells. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 1, p. 4487-4495, 2013.
- 115 HUYNH, D. P. et al. Functionalized injectable hydrogels for controlled insulin delivery. **Biomaterials**, v. 29, n. 16, p. 2527-2534, 2008.
- 116 HUYNH, C. T. et al. Synthesis and characterization of poly (amino urea urethane)-based block copolymer and its potential application as injectable pH/temperature-sensitive hydrogel for protein carrier. **Polymer**, v. 53, n. 19, p. 4069-4075, 2012.
- 117 HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.
- 118 PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110-111, 1985.
- 119 WANG, S. Ordered mesoporous materials for drug delivery. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 117, n. 1/2, p. 1-9, 2009.
- 120 FERNANDES, A. J. D. **Fosfato de cálcio mesoporosos e como nanocompósitos com sílica: síntese, caracterização e ensaios de liberação controlada de fármaco.** 2011. 168 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

121 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.

122 CHIAPPETTA, D. A. et al. Comprimidos bioadhesivos formulados con excipientes hidrofílicos para uso bucofaríngeo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 360-365, 2006.

123 RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

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

125 MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

126 GIESCHE, H. Synthesis of monodispersed silica powders ii: controlled growth reactions and continuous production processes. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 14, n. 3, p. 205-214, 1994.

127 TAHA, E. A.; YOUSSEF, N. F. Spectrophotometric determination of some drugs for osteoporosis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 12, p. 1444-1447, 2003.

128 SHRIVER, D. C.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 847 p.

129 CULLITY, B. D. **Elements of x-ray diffraction**. 2nd ed. Reading: Addison-Wesley, 1978. 555 p.

130 HAUCH, K. D.; RATNER, B. D. Microscopy for biomaterials science. In: RATNER, B. D. et al. (Ed.). **Biomaterials science: an introduction to materials**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 677-692.

131 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

132 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

133 REDDY, P. M.; UMAPATHI, R.; VENKATESU, P. Interactions of ionic liquids with hydration layer of poly(N-isopropylacrylamide): comprehensive analysis of biophysical techniques results. **Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP**, v. 16, n. 22, p. 10708-10718, 2014.

134 MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire, 2004. 288 p.

135 CHIOU, W. I. N. L.; RIEGELMANT, S. Pharmaceutical applications of solid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 9, p. 1281-1302, 1971.

136 SEKIGUCHI, K.; OBI, N. Studies on absorption of eutectic mixture I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 11, p. 866-872, 1961.

137 LAW, D. et al. Properties of rapidly dissolving eutectic mixtures of poly(ethylene glycol) and fenofibrate: the eutectic microstructure. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 3, p. 505-515, 2003.

138 MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos**: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

139 ASNANI, M. et al. Ab initio structure determination of anhydrous sodium alendronate from laboratory powder X-ray diffraction data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 6, p. 2113-2121, 2009.

140 TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD. (Petah Tiqva). N. Finkelstein; R. Lidor-Hadas; J. Aronhime. **Hydrate forms of alendronate sodium, processes for manufacture thereof, and pharmaceutical compositions thereof**. US 6963008B2. 31 Dec. 2003, 8 Nov. 2005.

141 ANANCHENKO, G. et al. Alendronate sodium. In: BRITAIN, H. G. (Ed.). **Profiles of drug substances, excipients, and related methodology**. San Diego: Academic Press, 2013. p. 2-34.

142 WU, H. C. et al. A novel biomagnetic nanoparticle based on hydroxyapatite. **Nanotechnology**, v. 18, n. 16, p. 165601/1-165601/10, 2007.

143 HENCH, L. L.; BEST, S. M. Ceramics, glasses, and glass-ceramics. In: RATNER, B. D. et al. (Ed). **Biomaterial science**: an introduction to materials in medicine. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. Chap. I.2.4, p. 128-151.

144 LIN-VIEN, D. et al. **The handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules**. San Diego: Academic Press, 1991. 503 p.

145 BEZERRA NETO, J. R. et al. Phosphate group vibrational signatures of the osteoporosis drug alendronate. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 45, n. 9, p. 801-806, 2014.

146 FATHY, M.; EL-BADRY, M. Preparation and evaluation of piroxicam-pluronic solid dispersions. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 2, p. 97-108, 2003.

- 147 DIXIT, M.; KINI, A.; KULKARNI, P. K. Enhancing solubility and dissolution of celecoxib by spray drying using Pluronic® F 127. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, n. 4, p. 346-352, 2011.
- 148 BAIG, A. A. et al. Relationships among carbonated apatite solubility, crystallite size, and microstrain parameters. **Calcified Tissue International**, v. 64, n. 5, p. 437-449, 1999.
- 149 AFERGAN, E. et al. ³¹P-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.
- 150 YUASA, H. et al. Application of the solid dispersion method to the controlled release of medicine. VI. Release mechanism of a slightly water soluble medicine and interaction between flurbiprofen and hydroxypropyl cellulose in solid dispersion. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 354-358, 1994.
- 151 NEVES, M. et al. Synthesis, characterization and biodistribution of bisphosphonates Sm-153 complexes: correlation with molecular modeling interaction studies. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 29, n. 3, p. 329-338, 2002.
- 152 ALMORA-BARRIOS, N.; LEEUW, N. H. Modelling the interaction of a Hyp-Pro-Gly peptide with hydroxyapatite surfaces in aqueous environment. **CrystEngComm**, v. 12, n. 3, p. 960-967, 2010.
- 153 GONÇALVES, G. E. et al. Síntese e caracterização de mulita utilizando sílica obtida da casca de arroz. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 62, n. 3, p. 367-372, 2009.
- 154 GIESCHE, H. Synthesis of monodispersed silica powders I. Particle properties and reaction kinetics. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 14, p. 189-204, 1994.
- 155 BEGANSKIENE, A. et al. Water based sol-gel synthesis of hydroxyapatite. **Materials Science (Medziagotyra)**, v. 9, n. 4, p. 383-386, 2003.
- 156 LIU, D. M. et al. Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 23, n. 7, p. 1679-1687, 2002.
- 157 GROSS, K. A.; GROSS, V.; BERNDT, C. C. Thermal analysis of amorphous phases in hydroxyapatite coatings. **Journal of American Ceramics Society**, v. 81, n. 1, p. 106-112, 1998.
- 158 BASAK, S. C.; KUMAR, K. S.; RAMALINGAM, M. Design and release characteristics of sustained release tablet containing metformin HCl. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 477-483, 2008.
- 159 SZEKALSKA, M. et al. Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, 2016. doi:10.1155/2016/769031.

- 160 SACHAN, K. N. et al. Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 8, p. 1191-1199, 2009.
- 161 REPKA, M. A., SINGH, A. Alginic acid. In: ROWE, R. C. et al. (Ed.). **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 20-22.
- 162 REMMINGHORST, U.; REHM, B. H. A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 21, p. 1701-1712, 2006.
- 163 GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n. 3, p. 267-285, 1998.
- 164 LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.
- 165 LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.
- 166 LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 7, p. 1869-1879, 2001.
- 167 LEROUX, M. A.; GUILAK, F.; SETTON, L. A. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 47, n. 1, p. 46-53, 1999.
- 168 SAKIYAMA-ELBERT, S.; HUBBELL, J. Functional biomaterials: design of novel biomaterials. **Annual Review of Materials Research**, v. 31, n. 1, p. 183-201, 2001.
- 169 LEE, K. Y.; YUK, S. H. Polymeric protein delivery systems. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 7, p. 669-697, 2007.
- 170 GRANT, G. T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 195-198, 1973.
- 171 JUÁREZ, P. et al. Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, p. 1-26, 2014.
- 172 KUO, C. K.; MA, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 22, n. 6, p. 511-521, 2001.
- 173 AUGST, A. D.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 8, p. 623-633, 2006.
- 174 O'BRIEN, J. et al. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

- 175 BLUMER, M. J. F. et al. Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. **Mechanisms of Development**, v. 129, n. 5/8, p. 162-176, 2012.
- 176 JANCKILA, A. J. et al. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 74-80, 2001.
- 177 MUKAIYAMA, K. et al. Elevation of serum alkaline phosphatase (ALP) level in postmenopausal women is caused by high bone turnover. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 27, n. 4, p. 413-418, 2015.
- 178 TSUBOI, H. et al. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, p. 196-203, 2003.
- 179 TARNOWSKI, B. I.; SPINALE, F. G.; NICHOLSON, J. H. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 66, n. 6, p. 296-302, 1991.
- 180 NEUFELD, D. A. et al. Actin fiber patterns detected by Alexafluor 488 phalloidin suggest similar cell migration in regenerating and nonregenerating rodent toes. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 278, n. 1, p. 450-453, 2004.
- 181 GREGORY, C. A. et al. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77-84, 2004.
- 182 DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura- aplicações e preparação de amostras - materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.
- 183 ABRAMI, M. et al. Physical characterization of alginate-pluronic F127 gel for endoluminal NABDs delivery. **Soft Matter**, v. 10, n. 5, p. 729-737, 2014.