

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS – PPGCEM**

**LUCIANO ANTUNES**

**BIOCIMENTOS NANOESTRUTURADOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO  
INCORPORADOS COM SILICA PARA ENTREGA DE FÁRMACOS NA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

**CRICIÚMA**

**2023**

**LUCIANO ANTUNES**

**BIOCIMENTOS NANOESTRUTURADOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO  
INCORPORADOS COM SILICA PARA ENTREGA DE FÁRMACOS NA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Elidio Angioletto  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sabrina Arcaro

**CRICIÚMA**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A636b Antunes, Luciano.

Biocimentos nanoestruturados de fosfatos de cálcio incorporados com sílica para entrega de fármacos na regeneração óssea / Luciano Antunes. - 2023.

148 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Criciúma, 2023.

Orientação: Elidio Angioletto.

Coorientação: Sabrina Arcaro.

1. Materiais nanoestruturados. 2. Nanopartículas de sílica. 3. Biocimento. 4. Materiais biomédicos. 5. Entrega controlada de medicamentos. I. Título.

CDD 23. ed. 620.5

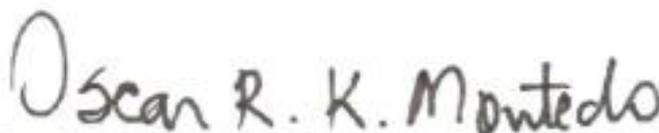
Luciano Antunes

Biocimentos nanoestruturados de fosfatos de cálcio incorporados com sílica para entrega de fármacos na regeneração óssea.

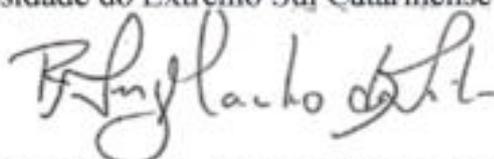
Esta Tese de Doutorado – TD foi julgada adequada à obtenção do grau de Doutor(a) em Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - PPGCEM (Área de concentração: Tecnologia de Materiais) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Criciúma, SC, 19 de outubro de 2023.

**Banca Examinadora:**



**Prof. Dr. Oscar Rubem Klegues Montedo**  
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC



**Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila**  
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC



**Prof. Dr. Enori Gemelli**  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC



**Profª Drª Mônica Beatriz Mathor**  
Universidade de São Paulo - USP

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeira a Deus por sempre ter me conduzido e me ajudado a superar mais esse desafio em minha vida.

A minha família, minha esposa Eliziane, e meu filho Augusto, pelo amor, carinho, incentivo e principalmente pela compreensão e paciência nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

Agradecimentos mais do que especiais aos meus orientadores, professor Dr. Elidio Angioletto e Dr<sup>a</sup> Sabrina Arcaro, pelos ensinamentos, paciência e pela amizade constituída durante esse período. Estendo meus agradecimentos aos vários colegas que me auxiliaram para a construção deste trabalho, os professores Ricardo Andrez, Rafael Sakata, Marcelo Tramontin, Daiara da Silva, aos bolsistas de iniciação científica Rafaela Anástacio e Cibele de Brito.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e possibilitarem um aprimoramento do trabalho desenvolvido.

Aos colegas de pesquisa dos laboratórios de pesquisa LADEBIMA, CERTEC e o Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Gostaria de agradecer a todos os professores do curso de Ciência da Computação pela compreensão e incentivo durante a trajetória. A UNESC pelo incentivo intelectual e financeiro.

Aos demais professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM), pelo conhecimento e amizade e a secretaria Vivian por todo o apoio prestado durante esse período.

## RESUMO

A prevalência da osteoporose como uma preocupação global em saúde tem impulsionado a busca por melhorias nos tratamentos existentes. Os bisfosfonatos, um grupo de medicamentos usados para tratar essa doença, enfrentam desafios significativos, incluindo baixa biodisponibilidade e potenciais efeitos adversos. Em resposta a essas limitações, a pesquisa está focada no desenvolvimento de sistemas de entrega de bisfosfonatos mais eficazes. Nesse contexto, os biocimentos à base de fosfato de cálcio surgiram como potenciais transportadores de medicamentos. No entanto, a área superficial limitada desses biocimentos restringe sua capacidade de transportar quantidades substanciais de medicamentos. Portanto, este estudo visa superar essa limitação explorando o potencial de nanopartículas de sílica, com sua elevada área superficial, como uma inovação significativa no projeto de sistemas de entrega de medicamentos para o tratamento da osteoporose. Foram preparados cinco biocimentos à base de fosfato de cálcio, e diferentes concentrações de nanopartículas de sílica foram adicionadas. Os compostos passaram por dois métodos de cura e foram avaliados quanto ao seu comportamento estrutural, microestrutural e de hidratação. Os medicamentos inseridos nos biocimentos foram o alendronato sódico e o risedronato sódico. Estes, juntamente com os compostos de biocimento, passaram por ensaios biológicos para avaliar sua citotoxicidade. Os resultados mostraram que a adição de nanopartículas de sílica pode diminuir ou aumentar a resistência mecânica, dependendo do processo de cura do compósito de biocimento. Os compósitos com cura úmida chegaram a apresentar mais de 1 MPa, além apresentarem apenas a fase hidroxiapatita. Ensaios *in vitro* demonstraram que os compósitos de biocimento não apresentaram citotoxicidade e até mesmo reduziram a do alendronato sódico quando incorporados nos compósitos. O ensaio de entrega do fármaco evidenciou a entrega de 50% do risedronato sódico para todos os compósitos nos primeiros 14 min, demonstrando uma entrega abrupta inicial, porém os compósitos 3 e 4 não haviam realizado a entrega total do medicamento ao final do ensaio, demonstrando dessa forma um entrega controlada do fármaco após os minutos iniciais. Graças a isso, não há risco de danificar células saudáveis. O compósito preparado pode ser uma alternativa para a entrega local de medicamentos.

Palavras-chave: Biocimento, nanopartículas de sílica, biocompatibilidade

## ABSTRACT

The prevalence of osteoporosis as a global health concern has driven the search for improvements in existing treatments. Bisphosphonates, a group of medications used to treat this disease, face significant challenges, including low bioavailability and potential adverse effects. In response to these limitations, research is focused on the development of more effective bisphosphonate delivery systems. In this context, calcium phosphate-based biocements have emerged as potential drug carriers. However, the limited surface area of these biocements restricts their ability to transport substantial amounts of medication. Therefore, this study aims to overcome this limitation by exploring the potential of silica nanoparticles, with their high surface area, as a significant innovation in the design of drug delivery systems for osteoporosis treatment. Five calcium phosphate-based biocements were prepared, and different concentrations of silica nanoparticles were added. The compounds underwent two curing methods and were evaluated for their structural, microstructural, and hydration behavior. The drugs incorporated into the biocements were sodium alendronate and sodium risedronate. These, along with the biocement compounds, underwent biological assays to assess their cytotoxicity. The results showed that the addition of silica nanoparticles can either decrease or increase mechanical strength, depending on the curing process of the biocement composite. Composites with wet curing have achieved over 1 MPa, in addition to having only the hydroxyapatite phase. In vitro assays demonstrated that the biocement composites showed no cytotoxicity and even reduced the cytotoxicity of sodium alendronate when incorporated into the composites. The drug delivery assay revealed the delivery of 50% of sodium risedronate for all composites in the first 14 minutes, demonstrating an initial abrupt delivery. However, composites 3 and 4 had not completed the total delivery of the medication by the end of the assay, thus demonstrating controlled drug delivery after the initial minutes. Thanks to this, there is no risk of damaging healthy cells. The prepared composite can be an alternative for local drug delivery.

**Keywords:** Biocement, silica nanoparticles, biocompatibility.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Artigos publicados no <i>Scopus</i> no período de 2003 a 2022 relacionados a biomateriais e osteoporose e fraturas ósseas. ....	18
Figura 2 – Artigos publicados no <i>Scopus</i> no período de 2003 a 2022 relacionados ao alendronato sódico e risedronato sódico. ....	21
Figura 3 – Componentes que constituem o tecido ósseo. ....	24
Figura 4 – Classificação dos biomateriais de acordo com o seu comportamento fisiológico: (a) biotoleráveis (b) bioinertes (c) bioativos (d) biorreabsorvíveis. ....	30
Figura 5 – Etapas envolvidas na ciência de biomateriais e o caminho de necessidade de um dispositivo médico fabricado. ....	31
Figura 6 - Abordagens de Síntese de nanomateriais: <i>Top-Down e Bottom-Up</i> . ....	38
Figura 7 – Célula unitária da Hidroxiapatita. ....	43
Figura 8 – Reações do tecido ósseo na interação com o biocimento: (a) preenchimento com biocimento, (b) adsorção do biomaterial, (c) neoformação óssea e (d) formação óssea completa. ....	47
Figura 9 – Liberação de medicamentos convencional x controlada. ....	51
Figura 10 – Principais nanomateriais nos sistemas de liberação de fármacos para osteoporose. ....	53
Figura 11 – Principais formas de administração de medicamentos para osteoporose com biomateriais. ....	54
Figura 12 – Fluxograma da síntese das nanopartículas de sílica (rota 1 e 2). ....	61
Figura 13 – Fluxograma da síntese do biocimento de Hidroxiapatita. ....	63
Figura 14 – Fluxograma da obtenção do biocimento e dos compósitos com adição de nanopartículas de sílica. ....	65
Figura 15 – Análise termogravimétrica e DSC das nanopartículas de sílica: (A) rota 1 e (B) rota 2. ....	80
Figura 16 – Espectroscopia de Infravermelho das nanopartículas: (A) rota 1 e (B) rota 2. ....	82
Figura 17 – Imagem de nanopartículas de sílica obtida por MEV (A) 100 $\mu\text{m}$ (B) 10 $\mu\text{m}$ (C) 1 $\mu\text{m}$ . ....	83
Figura 18 – Imagem de nanopartículas de sílica obtida por MET para as nanopartículas de sílica para a rota 1(A) e (B) e rota 2 (C) e (D). ....	84
Figura 19 – Análise termogravimétrica e DSC do fosfato de cálcio. ....	86

Figura 20 – Difração de Raios X do fosfato de cálcio.....	87
Figura 21 – Espectroscopia de Infravermelho do fosfato de cálcio sintetizado. ....	89
Figura 22 – Imagem de nanopartículas do fosfato de cálcio obtida por MET.....	90
Figura 23 – Termogravimetria das nanopartículas de biocimento.....	92
Figura 24 – Difratoograma de Raio X do biocimento obtido.....	93
Figura 25 – Espectroscopia de infravermelho do biocimento obtido. ....	95
Figura 26 – Imagem de nanopartículas do biocimento obtido por MET .....	96
Figura 27 – Difratoograma de Raio X do biocimento hidratado: (A) cura a seco e (B) cura úmida.....	97
Figura 28 – Difratoograma de raios X dos compósitos de biocimento com cura a seco. ....	99
Figura 29 – Difratoograma de raios X dos compósitos de biocimento sintetizados com umidade e temperatura controladas. ....	100
Figura 30 – Ensaio de tempo de pega das cinco amostras hidratadas de biocimento e dos compósitos estudados.....	102
Figura 31 – Porosidade dos compósitos de biocimento nos períodos de 7, 14 e 28 dias.....	104
Figura 32 - Fluxo de calor em função do tempo de hidratação das composições a partir do ensaio de calorimetria de indução isotérmica.....	106
Figura 33 – Resistência mecânica no ensaio de compressão diametral dos compósitos de biocimento nos períodos de 7, 14 e 28 dias: (A) cura a seco e (B) cura úmida. ....	108
Figura 34 – Módulo de elasticidade dos compósitos de biocimento nos períodos de 7, 14 e 28 dias.....	110
Figura 35 – Ensaio de Flexão para os compósitos de biocimentos com cura a seco nos períodos de 7, 14 e 28 dias. ....	112
Figura 36 – Ensaio de fluido corporal simulado (SBF) nos períodos de 7, 14 e 28 dias. ....	113
Figura 37 – Imagem de nanopartículas do biocimento obtida por MEV. ....	115
Figura 38 – Imagem de nanopartículas do compósito 1 obtida por MEV. ....	115
Figura 39 – Imagem de nanopartículas do compósito 2 obtida por MEV. ....	116
Figura 40 – Imagem de nanopartículas do compósito 3 obtida por MEV. ....	116
Figura 41 – Imagem de nanopartículas do compósito 4 obtida por MEV. ....	117
Figura 42 – Espectroscopia das cinco amostras de biocimento em 7 dias. ....	119
Figura 43 – Espectroscopia das cinco amostras de biocimento em 14 dias. ....	119

Figura 44 – Espectroscopia das cinco amostras de biocimento em 28 dias. ....	120
Figura 45 - Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> de diferentes concentrações (10, 20 e 40 µg/mL) dos cimentos ósseos. Diferenças significativas em relação ao grupo controle, são demonstradas por * $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey). .....	123
Figura 46 – Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> de diferentes concentrações (10, 20 e 40 µg/mL) do Alendronato Sódico e risedronato de sódico. Diferenças significativas em relação ao grupo controle, são demonstradas por * $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey). ....	124
Figura 47 - Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> de diferentes concentrações (10, 20 e 40 µg/mL) dos cimentos ósseos com Alendronato. Diferenças significativas em relação ao grupo controle, são demonstradas por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,0005$ (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey). ....	125
Figura 48 - Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> de diferentes concentrações (10, 20 e 40 µg/mL) dos cimentos ósseos com Risedronato Sódico. Diferenças significativas em relação ao grupo controle, são demonstradas por * $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey). ....	126
Figura 49 - Teste de Hemocompatibilidade do Alendronato Sódico e do Risedronato sódico em diferentes concentrações (100, 200 e 400 µg/mL) (C). Diferenças significativas são mostradas $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey). ....	127
Figura 50 - Teste de Hemocompatibilidade dos cimentos ósseos de diferentes concentrações (100, 200 e 400 µg/mL). Diferenças significativas são mostradas $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey). ....	128
Figura 51 - Teste de Hemocompatibilidade dos cimentos com Alendronato Sódico de diferentes concentrações (100, 200 e 400 µg/mL). Diferenças significativas são mostradas $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey). ....	128
Figura 52 - Teste de Hemocompatibilidade dos cimentos com Risedronato Sódico de diferentes concentrações (100, 200 e 400 µg/mL). Diferenças significativas são mostradas $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey). ....	129

Figura 53 – Ensaio de entrega do fármaco risedronato sódico por meio dos compósitos de biocimento estudados..... 130

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Biomateriais metálicos, propriedades e aplicações. ....	32
Quadro 2 – Biomateriais polímeros, propriedades e aplicações. ....	33
Quadro 3 – Classes dos biomateriais, suas vantagens, desvantagens e aplicações no sistema ósseo. ....	34
Quadro 4 – Métodos de obtenção de nanomateriais.....	39
Quadro 5 – Fosfatos de cálcio com suas fórmulas químicas e razão molar Ca/P.....	42
Quadro 6 – Métodos de preparação da Hidroxiapatita.....	44
Quadro 7 – Métodos de síntese de Hidroxiapatita. ....	45
Quadro 8 – Amostras de compósitos de biocimento sintetizadas. ....	66
Quadro 9 – Área superficial das partículas de sílica obtidas por diversos autores....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de objetos em escala nano.....	36
Tabela 2 – Área superficial (ABET), volume (VPBJH) e raio (RPBJH) das nanopartículas de sílica.....	78
Tabela 3 – Fases do fosfato de cálcio sintetizado.....	87
Tabela 4 – Análise química do biocimento sintetizado.....	91
Tabela 5 – Fases presentes no pó de biocimento sintetizada.....	94
Tabela 6 – Área superficial (ABET), volume (VPBJH) e raio (RPJH) dos compósitos de biocimentos.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

BET - *Brunauer– Emmett–Teller*

BJH - *Barrett-Joyner-Halenda*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CFC – Cimento de fosfato de cálcio

CTAB - Surfactante Brometo de Cetiltrimetilamonio

DRX - Difração de raios X

DSC - Calorimetria diferencial de varredura

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

HPA – Hidroxiapatita

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MPa – Mega Pascal

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

NPs – Nanopartículas

PLLA - Poli-L-ácido láctico

PPGCS – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

SBF – Fluido Corporal Simulado

TCP - Fosfato tricálcico

TEOS - Ortosilicato de tetraetila

TGA - Análise termogravimétrica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1 OBJETIVOS .....	21
1.1.1 Objetivo Geral .....	22
1.1.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
2.1 TECIDO ÓSSEO .....	23
2.1.1 Matriz Óssea .....	25
2.1.2 Patologias e fraturas ósseas .....	26
2.2 BIOMATERIAIS .....	27
2.2.1 Utilização de biomateriais na substituição, regeneração e reparo ósseo.	32
2.3 NANOTECNOLOGIA .....	35
2.3.1 Nanopartículas de Sílica .....	37
2.3.2 Obtenção de Nanopartículas .....	38
2.3.2.1 Top-Down .....	39
2.3.2.2 Bottom-Up .....	39
2.3.2.2.1 Método Stöber .....	40
2.4 FOSFATOS DE CÁLCIO .....	41
2.4.1 Hidroxiapatita .....	43
2.4.1.1 Sínteses de hidroxiapatita .....	44
2.5 BIOCIMENTOS .....	46
2.5.1 Biocimentos: Estado da Arte .....	48
2.6 ENTREGA DE MEDICAMENTOS ( <i>DRUGS-DELIVERY</i> ) .....	50
2.6.1 Entrega de medicamentos com cimentos de fosfatos de cálcio .....	54
2.6.1.1 Medicamentos para regeneração óssea .....	55
2.6.1.1.1 Alendronato sódico .....	56
2.6.1.1.2 Risedronato sódico .....	57
<b>3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>59</b>
3.1 MATERIAIS .....	59
3.1.1 Nanopartículas de sílica .....	59
3.1.2 Síntese de biocimento de hidroxiapatita .....	60
3.1.3 Medicamento .....	60
3.2 MÉTODOS .....	61

<b>3.2.1 Síntese das nanopartículas de sílica</b> .....	<b>61</b>
3.2.1.1 Síntese das nanopartículas de sílica na rota 1.....	62
3.2.1.2 Síntese das nanopartículas de sílica na rota 2.....	62
<b>3.2.2 Síntese do biocimento</b> .....	<b>63</b>
<b>3.2.3 Obtenção dos Compósitos</b> .....	<b>64</b>
<b>3.2.4 Hidratação dos compósitos</b> .....	<b>66</b>
<b>4 CARACTERIZAÇÃO DE MATÉRIAS-PRIMAS E MATERIAIS</b> .....	<b>67</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA .....	67
4.1.1 Área de superfície específica .....	67
4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho .....	67
4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	67
4.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	67
4.1.5 Análise DSC/TG .....	68
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCIMENTO E DOS COMPÓSITOS .....	68
<b>4.2.1 Caracterização do pó do biocimento e dos compósitos</b> .....	<b>68</b>
4.2.1.1 Difração de Raios X.....	68
4.2.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	68
4.2.1.3 Espectroscopia de Infravermelho .....	69
4.2.1.4 Análise DSC/TG .....	69
<b>4.2.2 Biocimento e compósitos hidratados</b> .....	<b>69</b>
4.2.2.1 Calorimetria de condução isotérmica .....	69
4.2.2.2 Cura do biocimento e dos compósitos.....	70
4.2.2.3 Porosidade .....	70
4.2.2.4 Resistência mecânica à compressão diametral e módulo de elasticidade ....	71
4.2.2.5 Ensaio de flexão.....	71
4.2.2.6 Difração de Raios X.....	72
4.3 TESTES <i>IN VITRO</i> .....	72
<b>4.3.1 Fluido corporal simulado</b> .....	<b>72</b>
<b>4.3.2 Viabilidade celular</b> .....	<b>73</b>
4.3.2.1 Teste de viabilidade celular – MTT.....	74
<b>4.3.3 Hemocompatibilidade</b> .....	<b>74</b>
<b>4.3.4 Ensaio de liberação do medicamento</b> .....	<b>75</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
5.1 NANOPÁRTÍCULAS DE SÍLICA .....	77

<b>5.1.1 Área superficial (BET)</b> .....	<b>77</b>
<b>5.1.2 Análise TGA</b> .....	<b>80</b>
<b>5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)</b> .....	<b>81</b>
<b>5.1.4 Análise morfológica das nanopartículas de sílica obtidas pela rota 1 por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	<b>83</b>
<b>5.1.5 Análise morfológica das nanopartículas de sílica obtidas pela rota 1 e 2 por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b> .....	<b>84</b>
<b>5.2 FOSFATO DE CÁLCIO</b> .....	<b>85</b>
<b>5.2.1 Análise TGA</b> .....	<b>85</b>
<b>5.2.2 Difração de Raios X</b> .....	<b>87</b>
<b>5.2.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)</b> .....	<b>88</b>
<b>5.2.4 Análise morfológica do pó de fosfato de cálcio por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b> .....	<b>89</b>
<b>5.3 BIOCIMENTO</b> .....	<b>90</b>
<b>5.3.1 Análise química</b> .....	<b>91</b>
<b>5.3.2 Análise TGA</b> .....	<b>92</b>
<b>5.3.3 Difração de Raios X</b> .....	<b>93</b>
<b>5.3.4 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)</b> .....	<b>95</b>
<b>5.3.5 Análise morfológica do pó de biocimento por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b> .....	<b>96</b>
<b>5.3.6 Biocimento Hidratado</b> .....	<b>97</b>
<b>5.4 BIOCIMENTOS – COMPÓSITOS</b> .....	<b>98</b>
<b>5.5 COMPÓSITO HIDRATADO</b> .....	<b>99</b>
<b>5.5.1 Ensaio de cura do biocimento e dos compósitos estudados</b> .....	<b>102</b>
<b>5.5.2 Ensaio de porosidade</b> .....	<b>103</b>
<b>5.5.3 Calorimetria de condução isotérmica</b> .....	<b>105</b>
<b>5.5.4 Ensaio resistência mecânica à compressão diametral</b> .....	<b>107</b>
<b>5.5.5 Módulo de elasticidade</b> .....	<b>109</b>
<b>5.5.6 Ensaio de flexão</b> .....	<b>111</b>
<b>5.5.7 Ensaio de Fluido corporal simulado (SBF)</b> .....	<b>113</b>
5.5.7.1 Análise morfológica dos compósitos de biocimento por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	114
5.5.7.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	118
<b>5.6 TESTES <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>122</b>

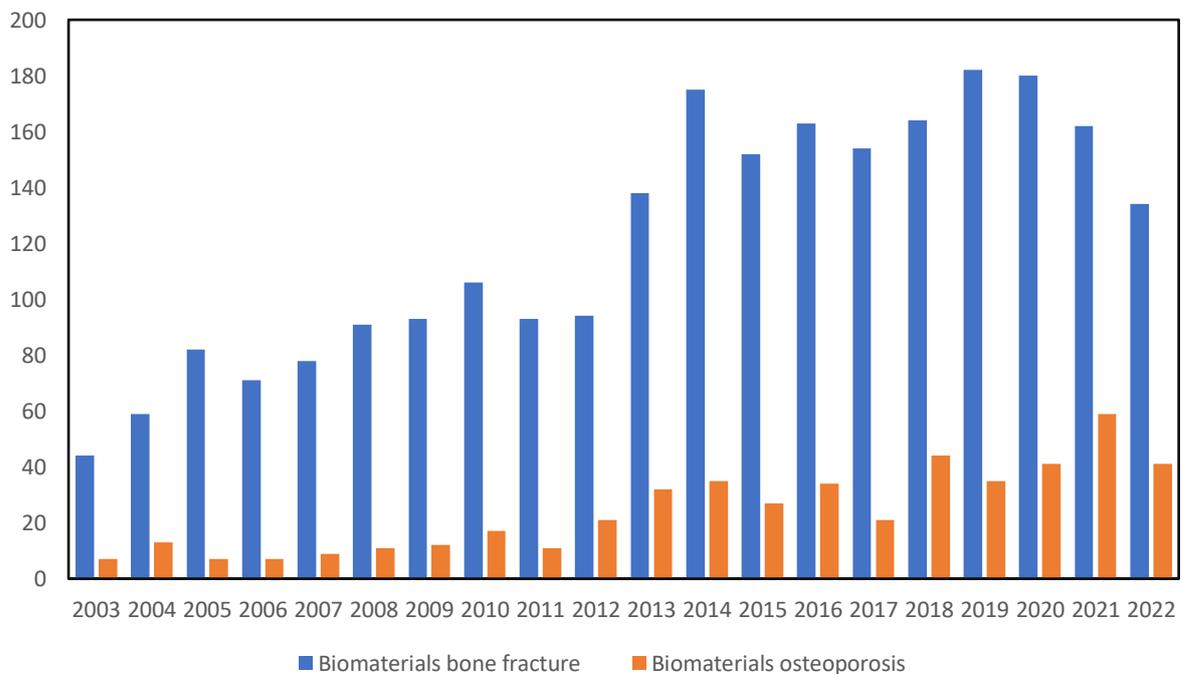
5.6.1 VIABILIDADE CELULAR DOS COMPÓSITOS DE BIOCIMENTOS.....	122
5.6.2 HEMOCOMPATIBILIDADE DOS COMPÓSITOS DE BIOCIMENTO.....	126
5.6.3 ENTREGA DE FÁRMACOS.....	129
5.6.3.1 Entrega com o Risedronato sódico.....	129
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>132</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>134</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma patologia óssea que, sem apresentar sintomas específicos, causa mais de 8,9 milhões de fraturas em pessoas por ano em todo o mundo. Esta doença afeta principalmente as mulheres e estima-se que uma em cada três mulheres com mais de 50 anos sofrerão fraturas provenientes da osteoporose, enquanto nos homens, um em cada cinco. Fatores associados aumentam a proveniência de osteoporose tanto em homens e mulheres, como: alcoolismo e tabagismo (SBEM, 2017; ZHANG *et al.*, 2023).

Além deste elevado número de fraturas por patologias ósseas, existe muitas fraturas ósseas por trauma. Esse problema mundial de saúde, tem promovido um aumento significativo, no que se refere a pesquisa de desenvolvimento de biomateriais, conforme a Figura 1. Estas pesquisas, por sua vez, têm como objetivo reduzir o custo dos tratamentos e melhorar a qualidade de vida das pessoas que sofrem de alguma patologia óssea ou trama (SANTOS *et al.*, 2022).

Figura 1 – Artigos publicados no *Scopus* no período de 2003 a 2022 relacionados a biomateriais e osteoporose e fraturas ósseas.



Fonte: Scopus.

O osso apresenta uma estrutura complexa, que apesar de apresentar uma grande capacidade de autorregeneração, quando este sofre um grande dano, o organismo tem dificuldade em realizar a regeneração.

Os métodos tradicionais para reparação destes defeitos geralmente incluem autoenxerto (implante retirado do próprio indivíduo) e aloenxerto (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, de uma mesma espécie) de osso. Embora estes sejam os tratamentos padrão, estes podem ser ineficientes, uma vez que os enxertos ósseos são avasculares e dependentes de uma nova vascularização a partir da difusão (RATNER *et al.*, 2013).

Em ambos os casos, autoenxerto (implante retirado do próprio indivíduo) e aloenxerto (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, de uma mesma espécie) de osso; além do tecido doador ser normalmente escasso, o tempo de operação necessário para a retirada dos autoenxertos torna o procedimento dispendioso e pode haver significativa morbidade local associada à dor, infecção e hematoma. Nos aloenxertos, como em outros procedimentos cirúrgicos, há risco de infecção e/ou doenças transmissíveis, que podem provocar uma diminuição ou perda total dos fatores indutores do crescimento celular. Além disso, não existem muitos doadores. As mesmas premissas valem para o tratamento de doenças como a osteoporose (ZHANG *et al.*, 2020).

Outro método de reparação óssea é o preenchimento do defeito por meio do cimento ósseo ou biocimento (PAHLEVANZADEH *et al.*, 2019). Estes materiais vêm sendo muito utilizados no desenvolvimento de materiais para regeneração óssea (ROLLER; STOKER; COOK, 2020).

Dentre os biocimentos, aqueles produzidos a base de fosfato de cálcio merecem destaque. Esse fato deve-se às características que apresentam como: biocompatibilidade, bioatividade, solubilidade e semelhança com a apatita biológica. Além dessas características, esses materiais apresentam autofixação, injetabilidade e plasticidade (ROOZBAHANI; KHARAZIHA, 2019). A composição química dos biocimentos a base de fosfatos de cálcio favorece a liberação dos íons de cálcio e fósforo para o meio biológico. Essas características aceleram a velocidade de formação de uma nova estrutura óssea. Outra característica importante presente neste material são as microestruturas porosas interconectadas, com características físicas, químicas e mecânicas similares ao tecido ósseo humano. Além disso, essas

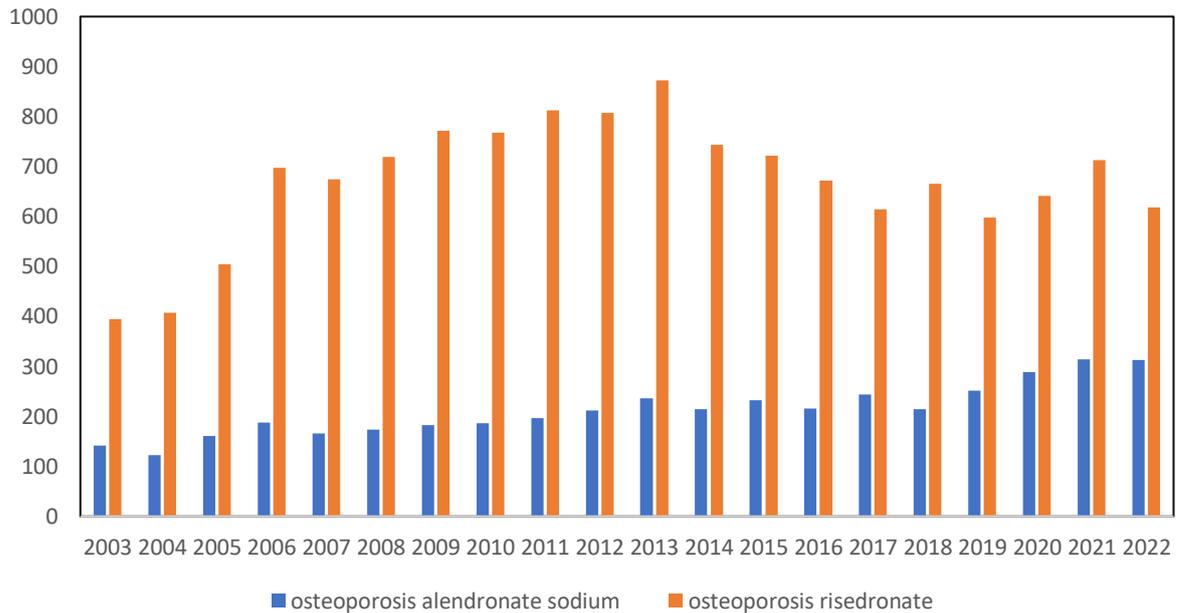
microestruturas são favoráveis ao carregamento de fármacos para liberação controlada em tratamentos da estrutura óssea (ARKIN *et al.*, 2021).

Por outro lado, em algumas situações, seria interessante que o biocimento apresentasse certa capacidade de carreamento de medicamento. Porém, essa estrutura não possui uma grande área superficial a ponto de carrear uma quantidade importante de medicamento. Neste sentido, as nanopartículas de sílica são materiais inorgânicos, robustos e de alta área superficial (LOURENÇO, 2016), que podem conter estruturas tridimensionais com espaços abertos entre si e que possuem altas concentrações de grupos silanóis (Si-OH), que auxiliam na funcionalização. Elas são biocompatíveis, não tóxicas, estáveis termicamente, possuem elevado potencial de adsorção, entre outras propriedades, que as tornam um excelente substrato para formação de compósito (ESCOTO-VIVERO, 2012).

Cabe destacar ainda que nanopartículas de sílica possuem importantes propriedades no que se refere à sua aplicação de sistemas de *drug-delivery*. Sua estrutura esférica pode servir para o encapsulamento de fármacos. Os silanóis Si-OH superficiais das nanopartículas de sílica possibilitam a aquisição de novas propriedades físico-químicas. Elas possuem elevada área superficial e volume de poros que permitem a incorporação dos fármacos em seus poros (FONSECA *et al.*, 2018)

Dentro deste contexto, o objetivo desta tese de doutorado foi avaliar a obtenção de biocimentos nanoestruturados de fosfatos de cálcio com adição de nanopartículas de sílica como carreador de medicamentos para regeneração óssea. Os medicamentos alendronato sódico e risedronato sódico, da classe dos bisfosfonatos, foram utilizados para acelerar o processo de regeneração e vem sendo muito utilizados em pesquisas relacionadas a osteoporose conforme pode-se observar na Figura 2.

Figura 2 – Artigos publicados no Scopus no período de 2003 a 2022 relacionados ao alendronato sódico e risedronato sódico.



Fonte: Scopus.

Diante do cenário apresentado, aspecto que ainda não está totalmente elucidado na literatura é o comportamento do biocimento adição de nanopartículas de sílica incorporadas nesta matriz como carregadores de medicamentos para possível utilização na regeneração óssea.

Para elucidar este fato, foram sintetizadas duas rotas de nanopartículas de sílica por meio do método Stöber. O medicamento escolhido para a entrega *in loco* foi o risedronato sódico, que se destaca no tratamento de regeneração óssea. Os compósitos obtidos foram caracterizados e posteriormente utilizados nos testes *in vitro* para análise da biocompatibilidade.

## 1.1 OBJETIVOS

Para a realização desta pesquisa apresentam-se os seguintes objetivos.

### 1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver biocimentos nanoestruturados de fosfatos de cálcio com adição de nanopartículas de sílica, como agente de *drug-delivery*, para aplicação em regeneração óssea no combate à osteoporose.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a razão biocimento/nanopartículas de sílica que obtenha as propriedades físico-químicas, mecânicas e de biocompatibilidade mais adequadas para regeneração óssea;
- Investigar a influência de diferentes nanopartículas e concentrações de sílica na liberação controlada dos fármacos alendronato sódico e risedronato sódico, a fim de determinar a mais adequada para a aplicação;
- Avaliar o perfil de liberação do fármaco risedronato sódico pelo compósito biocimento-nanopartículas de sílica obtido;
- Avaliar a resistência mecânica do biocimento com a incorporação de nanopartículas de sílica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TECIDO ÓSSEO

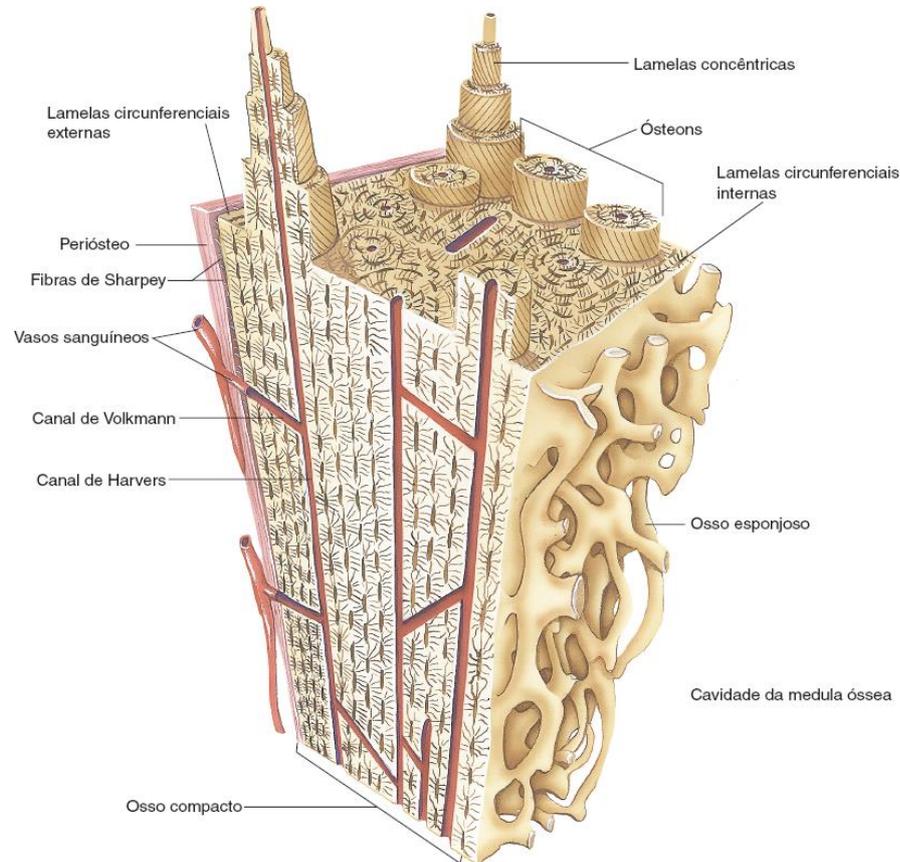
O tecido ósseo é um tecido conectivo, que possui como características uma matriz extracelular mineralizada; essa por sua vez diferencia o tecido ósseo dos outros tecidos conectivos. Este tecido forma uma estrutura extremamente rígida, que fornece suporte para proteção ao corpo. O sal mineral mais encontrado neste tecido é o fosfato de cálcio  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  que se combina com outro sal mineral, o hidróxido de cálcio  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ , para formar cristais de hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  (ROSS, 2015).

O tecido ósseo consiste em uma fase mineral, com 60% de hidroxiapatita, uma fase orgânica de 30%, formada por colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas, e 10% de água. Desta forma, a hidroxiapatita é a principal componente mineral dos ossos e dos dentes (BOSKEY, 2013).

O tecido ósseo recebe a classificação de primário e secundário. O primário, conhecido como imaturo, apresenta disposição irregular, não organizada das fibras colágenas e menor quantidade de cristais de hidroxiapatita. Este tipo de tecido é encontrado no feto e nos calos ósseos. O secundário, conhecido como maduro ou lamelar, possui fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno dos canais de Harvers, formando osso compacto ou esponjoso (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006). Os canais de Harvers são canais centrais onde estão localizados os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos; é neste local que as células ósseas se nutrem.

Na Figura 3 observa-se os componentes do tecido ósseo. Ela mostra uma trabécula óssea formada por matriz óssea acidófila (corada em *rosa*), no interior do qual estão os osteócitos, situados em cavidades da matriz óssea, chamadas lacunas. A superfície é recoberta por osteoblastos cúbicos ou achatados e por um osteoclasto, no qual se observam dois ou três núcleos (JUNQUEIRA, 2017).

Figura 3 – Componentes que constituem o tecido ósseo.



Fonte: Gartner (2018).

As células que compõem o tecido ósseo são divididas em funções de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea. Estes grupos celulares derivam de dois grandes grupos. O primeiro grupo é responsável pela formação e manutenção, no qual compreendem os osteoblastos, células de revestimento e os osteócitos, e o segundo grupo é o responsável pela reabsorção, os quais fazem parte os osteoclastos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação da matriz do osso e iniciam a mineralização. São encontradas na superfície da matriz óssea. Estas células possuem um nível elevado de enzima fosfatase alcalina, que quando liberadas contribuem para o processo de mineralização e, conseqüentemente, formação de cristais de hidróxiapatita. Como os osteoblastos são recobertos por uma matriz extracelular, eles acabam por tornar-se osteócitos (MEDRADO, 2014).

Os osteócitos são as células ósseas presentes em maior quantidade no tecido ósseo. Com relação ao tamanho, são menores que os osteoblastos. Estas células ocupam lacunas adequando as suas formas. Esta célula é responsável pelo controle metabólico diário com troca de nutrientes com o sangue. Além disso, são essenciais à manutenção e remodelação óssea, uma vez que se comunicam com os osteoblastos para que seja realizada a remodelação óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Os osteoclastos são células gigantes, que são responsáveis pela regeneração óssea, processo de reabsorção promovendo escavações na superfície óssea, que são conhecidas como *Howship*. Este processo ocorre pelo fato desta célula possuir uma membrana plasmática denominada zona clara, que está aderida a superfície óssea (MEDRADO, 2014) .

### **2.1.1 Matriz Óssea**

A matriz óssea do osso humano é constituída de uma parte orgânica e de uma parte inorgânica. A maior parte da matriz é constituída da parte orgânica com cerca de 95% da matriz total, na qual é formada por fibras colágenas. Embora a parte inorgânica represente a minoria da matriz óssea, cerca de 50% do peso da matriz está concentrado na parte inorgânica. Dentre os íons mais encontrados nessa matriz, destacam-se o fosfato e o cálcio; também são encontrados bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades (GARTNER, 2018).

Os cristais formados pelo cálcio e fosfato têm a estrutura do mineral hidroxiapatita, com a composição:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, existindo, portanto, uma camada de água e íons em volta dele, a qual é denominada capa de hidratação, que facilita a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial (JUNQUEIRA, 2017).

Os cristais de hidroxiapatita, em associação com a superfície das fibras colágenas, são responsáveis pela rigidez e pela resistência mecânica do tecido ósseo. Importante destacar que o mecanismo de calcificação ainda não possui uma explicação totalmente aceita. Entende-se que ela inicia deposição de sais de cálcio sobre as fibrilas colágenas (ROSS, 2015)

A hidroxiapatita sintética vem sendo muito estudada, por possuir em sua composição similaridade química e estrutural com a fase mineral dos ossos e dentes

de vertebrados. Além de ser osteocondutora, apresenta baixa toxicidade, biocompatibilidade e bioatividade. A hidroxiapatita pode induzir o crescimento do tecido ósseo onde for inserida pelo fato de apresentar uma estrutura porosa (SANTOS *et al.*, 2022).

### **2.1.2 Patologias e fraturas ósseas**

As patologias ósseas são distúrbios que afetam a estrutura, a função e o desenvolvimento do tecido ósseo. Essas condições podem ser causadas por uma variedade de fatores, incluindo traumas, doenças metabólicas, deficiências nutricionais, infecções e alterações genéticas. As fraturas representam a lesão óssea mais comum e são definidas como uma descontinuidade do osso (HANSEL, 2007).

Uma fratura óssea é a perda da continuidade de um osso; ocorre quando o este fica dividido em dois ou mais fragmentos. A fratura óssea ocorre geralmente numa situação em que um indivíduo sofre um trauma. A maior incidência de fraturas ocorre em dois grupos específicos: mulheres após a menopausa pelo surgimento da osteoporose e pessoas da terceira idade, por possuírem estrutura óssea e muscular mais frágil (BARRA, 2020).

As principais patologias relacionadas ao sistema ósseo são a osteoporose e osteoartrose. A osteoporose é definida como uma patologia no sistema ósseo que é caracterizada pelo comprometimento da resistência e da qualidade óssea, aumentando desta forma o risco de fraturas.

A osteoporose tem como característica patológica a retenção da espongirose primária com seus núcleos de cartilagem, falta de funilização da metáfise e córtex espessado. Os ossos, nestes casos, apresentam-se curtos e extremamente radiopacos e pesam até três vezes mais que o osso normal. Embora os ossos sejam espessos, seu desenvolvimento impróprio provoca a formação de ossos desorganizados, que podem sofrer fratura com maior facilidade (HANSEL, 2007).

Para a confirmação da patologia são realizados exames de imagem com o paciente. O tratamento desta patologia consiste na terapia medicamentosa com a utilização de estimuladores da formação óssea, como os estrogênios, a calcitonina e os bisfosfonatos. A osteoartrose é uma doença degenerativa que deve ser tratada com uso de bisfosfonatos, como: o alendronato sódico e o risedronato sódico, além

disso é fundamental a reposição de cálcio e vitamina D (GUARNIERO; OLIVEIRA, 2004).

## 2.2 BIOMATERIAIS

O termo biomaterial pode ser definido pela utilização de materiais que possuam origem natural ou sintética, que são utilizados por um período, de forma parcial ou completa, que auxilie ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano (HELMUS; TWEDEN, 1995).

Na utilização de biomateriais para restauração de tecidos vivos, é fundamental compreender a relação entre as propriedades e funções do material biológico. Desta forma, há que se considerar a interação entre o biomaterial e o corpo vivo (MENDES FILHO, 2006).

Os primeiros registros da utilização de biomateriais vêm desde o período da antiguidade. Foram observadas suturas de ouro na época do Antigo Egito no período 2000 a.C., assim como dentes artificiais feitos de conchas pela civilização Maia em 600 a.C. (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Inicialmente, a abordagem utilizada para o desenvolvimento de biomateriais era baseada em tentativa e erro. Na década de 50, com a utilização dos biomateriais de forma mais sistematizada, o foco do desenvolvimento estava na produção de materiais bioinertes. Estes materiais são aqueles que não causam reação no organismo, por possuírem uma estabilidade química elevada. Com o passar do tempo, a meta estava direcionada para o desenvolvimento de materiais bioativos. De forma mais recente, o grande objetivo tem sido a regeneração de um tecido, ou seja, o foco está no aspecto biológico. Os materiais bioativos são aqueles que interagem com o organismo, permitindo a formação de tecidos em sua superfície (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

As propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas, presentes nos biomateriais, influenciam no desempenho quando no contato com o organismo. Com relação às propriedades químicas, elas referem-se à composição, às ligações e às estruturas atômicas. As propriedades físicas estão relacionadas com o estado físico, a densidade e a porosidade. As mecânicas evidenciam a resistência e a dureza dos materiais. O comportamento biológico do material é evidenciado nas propriedades

biológicas. Cabe destacar que estas características dependem de mais de um fator associado, que podem determinar a propriedade final do material (LOPES, 2017).

Os biomateriais estão agrupados em quatro grandes categorias, que são: polímeros, metais, cerâmicas e compósitos. Os polímeros podem ser sintéticos ou de origem natural. Os metais mais utilizados são o titânio, os aços inoxidáveis e as ligas metálicas. Os biomateriais cerâmicos são utilizados em sua grande maioria na reparação, regeneração; neste grupo, os materiais mais utilizados são os fosfatos de cálcio e a alumina. O grupo dos compósitos tem a grande maioria de seus materiais formados por uma composição de polímero e material cerâmico (BANDYOPADHYAY; BOSE, 2013).

A biocompatibilidade é um conceito que está associado a dispositivos médicos implantáveis, que ficam em contato com os tecidos vivos por um período considerável. Cabe ressaltar que o biomaterial em contato com o sistema biológico não deve promover um evento adverso, seja no local de implantação ou de forma sistêmica (WILLIAMS, 2008).

Além da biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a osteocondutividade são descritas como propriedades importantes no desenvolvimento de biomateriais para tratamento ósseo. Os conceitos destas propriedades são destacados abaixo:

- **Biocompatibilidade:** Capacidade de um dispositivo desempenhar a sua função, realizando a integração nos tecidos do hospedeiro e de forma a não se provocar quaisquer efeitos indesejáveis (WILLIAMS, 2008);
- **Biodegradabilidade:** Fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do local de implantação (TABATA, 2009);
- **Osteocondutividade:** Consiste na habilidade de um biomaterial atuar como ligação direta ao tecido ósseo, funcionando como uma ponte (SILVA, 2018).

Além destas propriedades, de acordo com Hench e Wilson (1993), os biomateriais podem ser classificados em quatro grupos de acordo com o seu comportamento fisiológico:

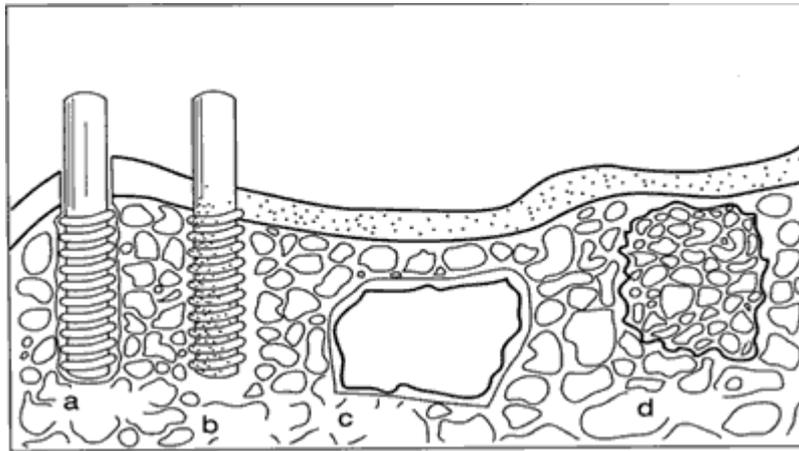
- **Biotoleráveis:** Materiais que são tolerados pelo organismo, porém são isolados do osso adjacente por meio da formação de uma camada de tecido fibroso. Essa camada é formada pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão por parte do material implantado. Caso a espessura do tecido

fibroso seja maior, menor será a tolerabilidade ao material. Praticamente todos os polímeros sintéticos e a grande maioria dos metais se enquadram nesta categoria;

- *Bioinertes*: Materiais que também são tolerados pelo organismo, porém a formação de tecido fibroso é mínima ou praticamente inexistente. Dessa forma, os implantes estão em contato direto com o tecido ósseo, ocorrendo participação na osteogênese. Destaca-se que mesmo assim, não ocorre nenhuma reação química entre o tecido e o implante. Não há, ao menos em quantidade detectável pelas células, liberação de nenhum componente. Exemplos de biomateriais bioinertes são: alumina, zircônia, titânio, tântalo, nióbio e carbono;
- *Bioativos*: Nesses materiais, ocorrem ligações químicas entre o material e o tecido ósseo, a osteointegração, ou seja, são materiais que interagem com o organismo, permitindo a formação de tecidos em sua superfície. Em função da similaridade química, a parte mineral do tecido ósseo se liga ao implante promovendo a osteocondução. Os principais materiais desta classe são: vidros, Ca-fosfato, vitro-cerâmicas, compostos de fosfato de cálcio e hidroxiapatita;
- *Bioabsorvíveis*: Esse grupo de materiais, após um determinado período em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Eles são indicados em aplicações clínicas nas quais não sejam necessárias novas intervenções cirúrgicas para retirada do implante. Os principais materiais dessa classe são o fosfato tricálcico (TCP) e o PLLA (poli-L-ácido láctico).

Esses comportamentos podem ser observados na Figura 4:

Figura 4 – Classificação dos biomateriais de acordo com o seu comportamento fisiológico: (a) biotoleráveis (b) bioinertes (c) bioativos (d) biorreabsorvíveis.



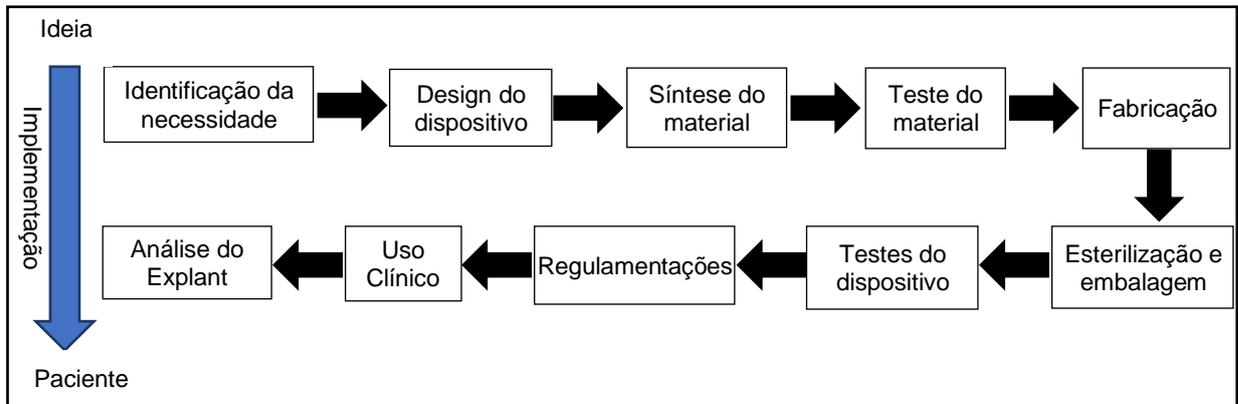
Fonte: Covered e Materials (2000).

Conforme destacado por Hench e Wilson (1993), no grupo dos materiais bioativos estão presentes principalmente materiais cerâmicos. Cerâmicas bioativas possuem a habilidade de criação de forte união ao redor do tecido ósseo. Essas características são atribuídas ao mecanismo de troca de íons, formação de sílica gel e a precipitação de camadas de hidroxiapatita na sua superfície. Dessa forma a hidroxiapatita mostra-se eficiente na promoção da osteointegração do implante (BROVARONE; VERNÉ; APPENDINO, 2006).

A cerâmica bioativa induz a mineralização do fosfato de cálcio por meio da interação com o plasma sanguíneo, ocorrendo dessa forma a primeira fase, interação com a superfície do implante após a inserção. Uma solução saturada de fosfato de cálcio pode representar potencial para a precipitação. Embora a condição para a precipitação do fosfato de cálcio seja favorável, a superfície do material deve induzir a uma nucleação heterogênea, posteriormente com o crescimento de uma camada de hidroxiapatita (ANDRADE; DOMINGUES, 2006).

O processo de obtenção de um biomaterial é constituído de várias etapas, que tem início na identificação da necessidade do material até o momento de sua utilização clínica e análise do produto desenvolvido, conforme é destacado na Figura 5.

Figura 5 – Etapas envolvidas na ciência de biomateriais e o caminho de necessidade de um dispositivo médico fabricado.



Fonte: Adaptado de Ratner *et al.* (2013).

A primeira etapa consiste em identificar a necessidade do desenvolvimento da aplicação. Posteriormente inicia-se o desenvolvimento do produto, identificando o caminho para o seu desenvolvimento, que começa com o projeto de síntese dos materiais. O produto resultante dessa síntese passa por diversos testes, incluindo: propriedades mecânicas, toxicológicas e estruturais, para que se possa identificar e avaliar o material mais apropriado para a necessidade inicial.

Após a definição da síntese a ser utilizada, realiza-se a etapa de esterilização e embalagem do biomaterial, que é encaminhado para a realização dos testes *in vitro* e *in vivo*. Com a aprovação destes testes, seguem para a etapa de regulamentação para a aprovação da utilização do biomaterial no mercado (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Por fim após a aprovação para o uso clínico do biomaterial, o processo de desenvolvimento continua com a análise e registro de *explants* extraídos de pacientes, que tem por objetivo identificar e corrigir as possíveis falhas da aplicação.

Como pode-se observar, o campo da ciência de biomateriais necessita da junção de pesquisadores de diversas áreas, que compartilham suas expertises para o desenvolvimento de aplicações desde a fase de identificação da necessidade até sua concepção (RATNER *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Utilização de biomateriais na substituição, regeneração e reparo ósseo

Conforme abordado no tópico anterior, os biomateriais são agrupados em quatro grupos: metais, cerâmicas, polímeros e compósitos.

Os metais possuem estrutura cristalina que proporciona ductibilidade, dureza, rigidez, além de possuírem grande quantidade de elétrons livres, que por essa razão são bons condutores de calor e eletricidade (CHEN; THOUAS, 2015). Eles são utilizados como biomateriais na área odontológica e ortopédica com destaque para aços inoxidáveis, titânio e metais nobres. O titânio possui características semelhantes ao cálcio, além de ser resistente à corrosão, apresentar boa resistência mecânica e a fadiga (DANTAS *et al.*, 2011). O Quadro 1 discorre sobre biomateriais metálicos, suas propriedades e aplicações

Quadro 1 – Biomateriais metálicos, propriedades e aplicações.

<b>Materiais</b>	<b>Módulo de elasticidade (GPa)</b>	<b>Limite de resistência à tração</b>	<b>Tenacidade à fratura (MPa.m<sup>1/2</sup>)</b>	<b>Aplicações</b>
Ligas CoCrMo	240	900-1540	100	Substituição de ossos e articulações, restaurações e implantes dentários, válvulas cardíacas
316L	200	540-1000	100	Fixação de fraturas, stents, instrumentos cirúrgicos
Ligas de Ti	105-125	100-250	80	Próteses, dispositivos para uso cardiovascular e para fixação de fraturas
Ligas de Mg	40-45	900	15-40	Próteses, dispositivos para uso cardiovascular e para fixação de fraturas
Ligas NiTi	30-50	1355	30-60	Placas ósseas, stents, fios ortodônticos

Fonte: adaptado de Long e Rack (1998).

Os metais, por permitirem diversas formas de tratamento e rugosidade, promovem a osseointegração; além disso podem se integrar a outros materiais como a hidroxiapatita, que quando combinados melhoram o crescimento ósseo e a osseointegração (GASIK, 2017). Este fenômeno é conhecido como a união física do implante com o osso receptor.

Os biomateriais constituídos de metais são amplamente utilizados como substitutos ósseos por possuírem resistência mecânica a altas cargas de tração e compressão. Destacam-se neste grupo as próteses de titânio devido a sua elevada biocompatibilidade, baixos valores de densidade e de módulo de elasticidade (SILVA, 2017).

Os polímeros podem ter origem sintética ou natural; destaque para os naturais por possuírem uma grande biodegradabilidade. Estes materiais possuem uma enorme capacidade elástica, que permite que sejam entrelaçados no local da aplicação. Em contrapartida não apresentam resistência mecânica para que possam ser utilizados na substituição óssea. Eles podem ser utilizados no revestimento de ligas metálicas para evitar inflamação ou necrose (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018).

No Quadro 2 pode-se observar os principais polímeros utilizados como biomateriais e suas propriedades.

Quadro 2 – Biomateriais polímeros, propriedades e aplicações.

	<b>Materiais</b>	<b>Módulo de elasticidade (GPa)</b>	<b>Resistência à tração (MPa)</b>
<b>Biodegradáveis</b>	Poli(L-ácido láctico)	2,7	5,0
	Poli(D,L-ácido láctico)	1,9	29
	Poli(caprolactano)	0,4	16
	Poli( $\beta$ -hidroxibutirato)	1,7	18,29
<b>Não Biodegradáveis</b>	Polietileno (PE)	0,88	35
	Poliuretano (PU)	0,02	35
	Politetrafluoretileno (PTFE)	0,5	27,5
	Polimetilmetacrilato (PMMA)	2,55	59
	Poli (tereftalato de etileno) (PET)	2,85	61

Fonte: Murugan e Ramakrishna (2005).

Estes materiais podem apresentar limitação mecânica, pois são afetados pelo ambiente, o que modifica sua estrutura e propriedades. Em contrapartida, se o biopolímero é processado para degradar em meio fisiológico, ele pode substituir um tecido ósseo por um período até que ocorra o reparo natural da região afetada (SILVA, 2017).

Os materiais cerâmicos podem apresentar estrutura cristalina ou não. Dentre as principais características deste tipo de material estão: possuem alta dureza, baixa condutividade térmica, apresentam isolamento elétrico e resistência à corrosão e tenacidade à fratura. Nesse grupo de materiais, destaque para a hidroxiapatita na utilização de biomateriais para tratamento de patologias ósseas (AMORIM *et al.*, 2020).

Estes materiais vêm sendo utilizados na fabricação de componentes de implantes e próteses ortopédicas para reparação e regeneração de tecido ósseo. Pelo fato de apresentarem uma baixa resistência mecânica para suportar cargas estáticas e dinâmicas, sua utilização fica restrita aos preenchimentos de defeitos ósseos e em recobrimento de próteses metálicas ortopédicas (SILVA, 2017).

A aplicação de biomateriais é uma área bastante ampla e em franco desenvolvimento. O Quadro 3 apresenta-se algumas aplicações da utilização de biomateriais.

Quadro 3 – Classes dos biomateriais, suas vantagens, desvantagens e aplicações no sistema ósseo.

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<b>Polímeros</b>	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Mandíbula, dente
<b>Metais e ligas</b>	Alta resistência à tração, alta resistência ao desgaste, energia de deformação alta	Baixa Biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes), implantes dentários

		mecânicas com tecidos conectivos moles e alta densidade	
<b>Cerâmicas</b>	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, alta resistência à compressão	Baixa resistência à tração, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade e alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões e traqueias artificiais
<b>Compósitos</b>	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, alta força de tensão	Material de fabricação incompatível	Implantes de junta de joelho (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade)

Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2020).

Conforme observa-se no Quadro 3, os biomateriais do grupo cerâmico destacam-se dos demais grupos quando a aplicação é voltada para o sistema ósseo. Destacando-se, ainda, nesse segmento, as cerâmicas de fosfato de cálcio por apresentarem similaridade química e estrutural com a apatita biológica. Cabe destacar ainda a capacidade desses materiais atuarem como suportes para carregamento de medicamentos, vacinas e hormônios (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

### 2.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia propõe o estudo e aplicação de objetos e dispositivos que tenham dimensões denominadas nano, que representa uma parte de um bilhão; dessa forma um nanômetro corresponde a um bilionésimo de um metro. O grande benefício do desenvolvimento de aplicações nano reside em propriedades significativas que são obtidas somente nessa escala (PIMENTA; MELO, 2007).

Um material é definido como Nanomaterial quando possui um tamanho menor ou igual a 100 nm em pelo menos uma dimensão. O termo nano tem origem

grega e significa “anão”. Na Tabela 1 observa-se alguns objetos na escala nano (FECHINE, 2020).

Tabela 1 – Exemplos de objetos em escala nano.

Objeto	Dimensões (nm)
Átomo de hidrogênio	0,1
Ribossomo	10
Célula	10-100
Vírus	20-450
Bactéria	1.000
Glóbulo vermelho no sangue	5.000
Formiga (~5 cm)	5.000.000
Pessoa (~190 cm)	2.000.000.000

Fonte: adaptado de Fechine (2020).

A nanotecnologia tem por característica a manipulação da matéria a uma escala atômica e molecular. A manipulação de objetos e materiais na escala manométrica permite a criação de estruturas que podem levar à formação de novos produtos ou otimização de outros já existentes. Os nanomateriais são produzidos de forma proposital para obtenção de propriedades elétricas, catalíticas, magnéticas, mecânica e térmicas que são de interesse operacional nos setores comercial, agrícola e médico (BOISSELIER; ASTRUC, 2009).

A dimensão reduzida proporciona ao material propriedades de superfície únicas, modificam a sua reatividade, frequentemente melhorando as suas propriedades mecânicas, óticas, elétricas e magnéticas (LOURO; BORGES; SILVA, 2013).

Por sua vez esses materiais em nanoescala, demonstraram propriedades diferentes ou aprimoradas se comparadas em macroescala, por essa razão esse tipo de material é objeto de tantas pesquisas realizadas (PETIT *et al.*, 1993).

Pode-se citar como exemplo o cobre, que em escala nano deixa de ser opaco e torna-se transparente. O alumínio, que é um material estável, torna-se um combustível e o ouro, até então insolúvel, torna-se solúvel (TARAFDAR; SHARMA; RALIYA, 2013).

As nanopartículas (NPs) podem ser obtidas de fontes naturais ou sintetizadas. Por possuir uma alta relação superfície / volume e propriedades antibacterianas, elas são utilizadas em muitas aplicações na área médica (BAPAT *et al.*, 2018).

Essa utilização na medicina tem como objetivo oferecer soluções que busquem aumentar a disponibilidade dos medicamentos, reduzindo os possíveis efeitos colaterais (MAMAEVA; SAHLGREN; LINDÉN, 2013; TANG; CHENG, 2013).

Nos últimos anos, as pesquisas relacionadas à aplicação de nanomateriais na medicina estão voltadas para: agentes de imagem e diagnóstico, regeneração de tecido, entrega local de fármacos, mapeamento de biomarcadores, terapia direcionada e imagem molecular (FECHINE, 2020).

### **2.3.1 Nanopartículas de Sílica**

As nanopartículas de sílica são materiais inorgânicos que possuem uma alta área superficial que muitas vezes dispõem de estruturas tridimensionais. Essas partículas são biocompatíveis, não apresentam toxicidade e possuem um grande potencial de adsorção (ZANONI *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2013).

As nanopartículas de sílica vêm despertando o interesse da comunidade científica pelo fato de possuírem características específicas, como: alta área de superfície que pode chegar até 2000 m<sup>2</sup>/g, tamanho de poro ajustável, variando entre 2-50 nm, excelente biocompatibilidade e capacidade de encapsular materiais. A possibilidade de alterar a superfície da sílica facilmente, torna o material altamente compatível com sistemas biológicos (SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2019 e COUTINHO, 2014)

Diversos métodos são utilizados para a síntese de nanopartículas de sílica. Dentre estes, destaca-se o processo sol-gel, precipitação química, processamento de microemulsão. As nanopartículas de sílica possuem diversas aplicações, em especial como biossensor, bioimagem, distribuição de drogas e terapia do câncer (SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2019).

O processo sol-gel é método versátil para a produção de nanopartículas de sílica. Esse processo envolve a conversão de uma solução líquida ou "sol" em uma fase sólida "gel" por meio de reações químicas. No processo sol-gel, a morfologia e o tamanho das partículas podem ser controlados, podendo variar de 60 a 1000 nm. Esse controle do tamanho é possível com a alteração de alguns parâmetros, como: pH, temperatura, solventes. Nesse processo, pode-se obter tamanhos médios entre 50 e 250 nm sem o uso de surfactante, e entre 20 e 60 nm usando surfactante (COUTINHO, 2014).

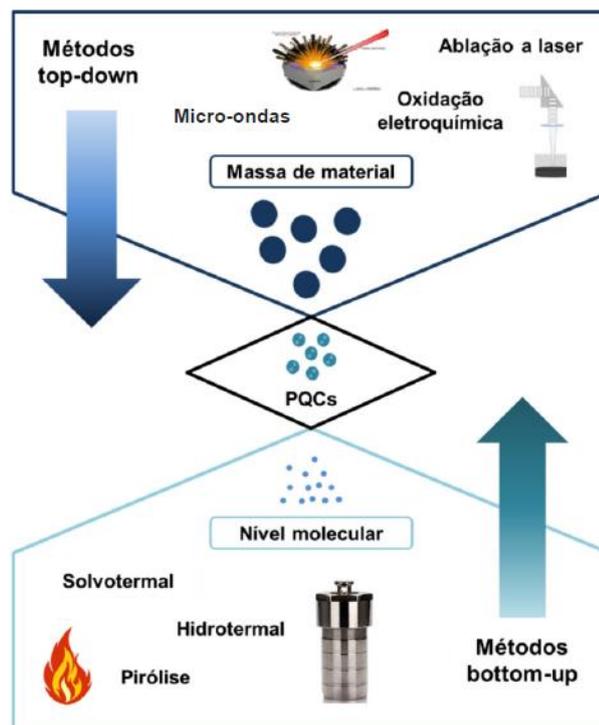
Na precipitação química, um precursor de sílica é misturado com uma solução aquosa de um agente precipitante, como hidróxido de amônio, o que leva à formação de partículas de sílica coloidais na solução. Essas partículas podem ser separadas da solução e posteriormente tratadas termicamente para produzir sílica nanoestruturada (SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2019).

As microemulsões são soluções isotrópicas, que contêm pelo menos três componentes, uma fase polar (geralmente água), uma fase apolar (geralmente óleo) e um surfactante. Esse método possibilita a obtenção de propriedades únicas, destacam-se tensão interfacial ultrabaixa, grande área interfacial, estabilidade termodinâmica e capacidade de solubilizar líquidos imiscíveis. Desta forma, permite o controle do tamanho, geometria, morfologia, homogeneidade e área superficial das partículas (MALIK; WANI; HASHIM, 2012)

### 2.3.2 Obtenção de Nanopartículas

Em geral, o desenvolvimento de nanomateriais é obtido por meio de duas abordagens, *Top-Down* e *Bottom-Up*. A Figura 6 ilustra estas duas abordagens.

Figura 6 - Abordagens de Síntese de nanomateriais: *Top-Down* e *Bottom-Up*.



Fonte: Fechine (2020).

### 2.3.2.1 Top-Down

A abordagem *Top-Down* é um processo físico de redução de partículas maiores em menores. Esse processo envolve a usinagem física de um material até uma faixa de tamanho nanométrico, por meio de processos de retificação, moagem, corrosão e litografia. Essa abordagem emprega a utilização de uma força física para a redução do tamanho de partículas (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006).

As três formas de força utilizadas na redução do tamanho dos materiais são compressão, impacto e cisalhamento. Impacto e cisalhamento são importantes na formação de nanopartículas para aplicações em alimentos (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006).

### 2.3.2.2 Bottom-Up

Na abordagem bottom-up, os precursores podem ser desestabilizados para formar um novo material. Neste processo é possível controlar o tamanho do material de síntese. Desta forma, o bottom-up garante um maior controle do tamanho dos nanomateriais sintetizados (CAI *et al.*, 2015).

Diversos processos químicos, físicos e conjugados são utilizados para a produção de nanomateriais nesta abordagem. Estes processos baseiam-se na química coloidal, eletroquímica e reações de síntese via combustão. Pode-se citar diversos métodos que utilizam essa abordagem, como: Sol-gel, combustão e pirólise via spray (HUANG; CHANG, 2008).

No Quadro 4 são apresentados os métodos de obtenção de nanomateriais.

Quadro 4 – Métodos de obtenção de nanomateriais.

Método	Condições	Vantagens	Desvantagens
Sol-gel	Métodos de síntese, que se caracterizam por uma reação em meio homogêneo “sol” que desestabilize o meio de forma controlada, formando partículas ou nanopartículas “gel”. Variáveis que podem alterar o controle da reação e	Produz óxidos com elevada pureza; controle extremamente rigoroso em todas as etapas do processo; Método via úmida, não exige nenhum equipamento especial; Produção de diversos tipos de produtos como filmes, sólidos ou mesmo pós;	Reagentes de elevado custo; Difícil controle do processo; Secagem é um processo crítico; Produção de pós desaglomerados é uma tarefa complexa

	consequentemente das nanoestruturas: tipo de solvente, concentração dos alcóxidos, temperatura e o pH	Permite sintetizar materiais inorgânicos com composição complexa Permite produzir nanopartículas com área superficial extremamente elevada (> 1000 m <sup>2</sup> /g)	
Combustão	Dissolução dos precursores em água (combustível e oxidantes) Aquecimento a uma temperatura acima da temperatura de autoignição da mistura; Formação do produto nanoestruturado	Grande volume de gases gerados na reação (CO <sub>2</sub> , NO <sub>x</sub> , H <sub>2</sub> O) ajudam a resfriar rapidamente o produto, evitando assim o crescimento dos cristalitos; Além disso, levam a formação de pós com estrutura porosa e boa área superficial	Produz pós fortemente aglomerados ou mesmo agregados; Pós como-sintetizados podem apresentar resquícios de carbono da reação de combustão; Necessidade de utilizar nitratos
pirólise via spray	Método empregado industrialmente; Pode ser adaptado para a síntese de uma grande variedade de materiais; Precursor (líquido ou gás saturado) é injetado em uma chama, onde ocorre a pirólise do precursor e formação das nanopartículas	Processo facilmente escalonável p/ nível de produção industrial Processo contínuo Custo do processo relativamente baixo permite obter uma ampla faixa de propriedades finais das nanopartículas Reagentes de baixo custo (acetatos também podem ser usados ao invés de alcóxidos)	Controle do processo é complexo devido ao grande número de parâmetros que devem ser controlados

Fonte: Adaptado de Arcaro e Venturini (2021).

#### 2.3.2.2.1 Método Stöber

Em 1968, Stöber desenvolveu o primeiro método de síntese de nanoesferas de sílica. Para a realização deste processo, foram utilizados solventes como metanol, etanol, n-propanol e n-butanol; como reagentes foram utilizados água, amônia e tetra-alqui-silicatos. O álcool colocado sob agitação mecânica, e é misturado com a solução amoniaca em um erlenmeyer, logo após é adicionado o tetra-alqui-silicatos (STÖBER; FINK; BOHN, 1968).

Este método de síntese de nanopartículas de sílica proporciona materiais com tamanhos uniformes e pode ser obtido de forma simples e eficiente (GUO *et al.*, 2018).

Esse método de síntese ainda hoje é o mais utilizado para o desenvolvimento de nanopartículas de sílica. Os ortossilicatos de tetraetila (TEOS) ou outros silicatos são suplementados em uma mistura com água, amônia e etanol sobre agitação mecânica (SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2019). A taxa de adição de TEOS no método Stöber provoca uma densidade mais alta nos centros de nucleação resultando em partículas menores (NOZAWA *et al.*, 2005).

Com base nesse método, a literatura apresenta algumas modificações, como por exemplo a concentração inicial dos reagentes e o tempo de agitação.

O método de Stöber é a mais conhecida síntese de partículas de sílica altamente esféricas e monodispersas, sob condições de crescimento controlado a uma escala nanométrica. Este método é o mais simples e eficaz a gerar esferas monodispersas de SiO<sub>2</sub>. As nanopartículas de sílica obtidas por meio deste método são altamente indicadas para a utilização como biomateriais, pois apresentam uma grande propriedade de encapsulamento para fármacos (CABRAL, 2015).

## 2.4 FOSFATOS DE CÁLCIO

Atualmente observa-se com grande frequência pesquisas relacionadas à utilização de biomateriais para substituição óssea (CAMARGO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017).

Dentre os biomateriais existentes, a classe dos cerâmicos vem sendo objeto de muitas pesquisas relacionadas ao tratamento de patologias e traumas ósseos (LOURENÇO, 2016).

Os fosfatos de cálcio, que são biocerâmicas, apresentam características mineralógicas semelhantes à apatita óssea humana, boa biocompatibilidade com o meio fisiológico, além de apresentar fortes ligações com o tecido ósseo (BONAN *et al.*, 2014).

As biocerâmicas de fosfato de cálcio são os biomateriais mais utilizados no que se refere à substituição óssea; isso deve-se ao fato de apresentarem similaridade química e cristalográfica presente no osso natural (LEVANDOWSKI JUNIOR, 2014).

Os fosfatos de cálcio podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Os naturais podem ser encontrados nos ossos humanos e de outros mamíferos. Os sintéticos são desenvolvidos em laboratório.

Os fosfatos de cálcio são estruturas constituídas em sua maioria pelos elementos de cálcio, fósforo e oxigênio. O fosfato é formado pelo agrupamento de fósforo e oxigênio, que pode incluir o elemento hidrogênio, formando assim ânions, que podem formar com o cálcio estruturas cristalinas ou amorfas, hidratadas ou não, e são constituintes de ossos e dentes (SAVICKI *et al.*, 2019).

Esses materiais podem apresentar-se em diferentes politipos, formando uma família de compostos conhecida por apatitas, representando uma das famílias de biomateriais mais complexas, por possuírem grandes variações na composição Ca/P, que pode variar de 0,5 a 2,0 (KUMTA *et al.*, 2005).

Essa composição permite a obtenção de diversos politipos de fosfatos de cálcio, como pode-se observar no Quadro 5.

Quadro 5 – Fosfatos de cálcio com suas fórmulas químicas e razão molar Ca/P.

<b>Fosfato de cálcio</b>	<b>Fórmula Química</b>	<b>Razão Molar</b>
Fosfato Monocálcico Mono-hidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$	0,5
Fosfato de cálcio Hidratado/Brushite	$\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio Fosfato de cálcio / Monetite	$\text{CaHPO}_4$	1,0
Fosfato Octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato Tricálcico /Whitlockite	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato Tetracálcico /Hilgenstockite	$\text{CaO}\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,0

Fonte: Adaptado de DE Grootl, Wolke e Jansen (1998).

Madureira *et al.*, (2020), demonstram que as composições de hidroxiapatita fosfato de cálcio se destacam por apresentarem biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade e osteocondutividade. Essas propriedades tornam essas biocerâmicas amplamente empregadas na ortopedia e odontologia.

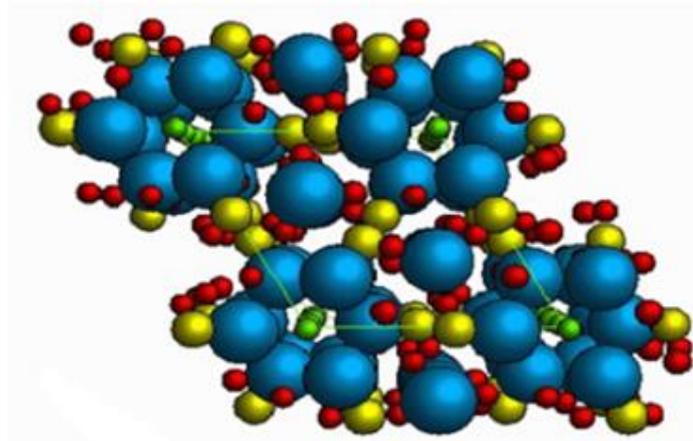
### 2.4.1 Hidroxiapatita

A Hidroxiapatita é um dos fosfatos de cálcio sintéticos mais utilizados como biomaterial ósseo; ela é do grupo mineral das apatitas, de fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e razão Ca/P igual a 1,67 (DA SILVA; ESPITALIER; NZIHOU, 2016).

A apatita biológica é deficiente em hidroxila e rica em carbonatos e possui uma razão molar de 1,67 de Ca/P. As propriedades e composição química da Hidroxiapatita sintética são semelhantes à biológica (SZCZESÍ; HOŁYSZ; CHIBOWSKI, 2017).

A Hidroxiapatita possui a sua célula unitária no formato hexagonal, contendo dez íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I, tetraédricos, e seis no sítio II, octaédricos. Os íons cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura. Na Figura 7 observa-se o arranjo estrutural da célula unitária da Hidroxiapatita (ALMQVIST, 1999).

Figura 7 – Célula unitária da Hidroxiapatita.



Fonte: Almqvist (1999).

As formas sintéticas de Hidroxiapatita possuem propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, tornando-as dessa forma ótimos substitutos do osso humano. Além dessas propriedades, elas possuem alta capacidade de adsorver moléculas, oferecendo um suporte para a ação prolongada de drogas. A Hidroxiapatita

pode ser encontrada na natureza em rochas ígneas e em esqueletos de espécies marinhas (COSTA *et al.*, 2009).

#### 2.4.1.1 Sínteses de hidroxiapatita

A forma sintética da hidroxiapatita pode ser obtida por diferentes técnicas, como por precipitação, hidrólise e síntese hidrotérmica, podendo também ser extraída de recursos naturais (SZCZEŚ; HOŁYSZ; CHIBOWSKI, 2017). No quadro 6 observa-se os métodos de preparação de Hidroxiapatita.

Quadro 6 – Métodos de preparação da Hidroxiapatita.

<p><b>Método Seco</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estado sólido</li> <li>- Mecanoquímica;</li> </ul>	<p><b>Método úmido</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Precipitação Química;</li> <li>- Hidrólise;</li> <li>- sol-gel</li> <li>- Hidrotérmico;</li> <li>- Emulsão;</li> <li>- Sonoquímica;</li> </ul>	<p><b>Processos de alta temperatura</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Combustão;</li> <li>- Pirólise;</li> </ul>	<p><b>Síntese de fonte biogênica</b></p>	<p><b>Combinações de procedimentos</b></p>
---	--	---	--	--

Fonte: Do autor.

Os métodos de síntese a seco não utilizam solventes. No processo de síntese do estado sólido, cálcio e fosfato são misturados a altas temperaturas, acima de 1000 °C. Na síntese mecanoquímica, os materiais são triturados e essa energia mecânica promove mudanças estruturais por meio das reações químicas obtidas (SZCZEŚ; HOŁYSZ; CHIBOWSKI, 2017). O processo de síntese a seco é responsável por produzir Hidroxiapatita fina e com boa cristalinidade (VALENTE, 1999).

Os métodos de síntese a úmido utilizam soluções que são realizadas em diferentes temperaturas. Nesse processo são utilizados diferentes solventes e aditivos com o objetivo de controlar a precipitação. Pode-se obter diferentes propriedades de Hidroxiapatita, que dependem da escolha do método de síntese úmida (SZCZEŚ; HOŁYSZ; CHIBOWSKI, 2017). A Hidroxiapatita produzida pelo método a úmido apresenta em geral deficiência de cálcio, apresentando uma proporção molar Ca/P menor que 1,67, ou tem em sua constituição carbonato, formando dessa forma uma proporção molar maior do que 1,67 (MENDES FILHO, 2006).

Na síntese de Hidroxiapatita utilizando fontes biogênicas, o material (casca de ovo, organismo marinho) é submetido ao processo de calcinação, que gera o CaO

e que, em seguida, é hidratado e reage com  $H_3PO_4$  (SZCZESÍ; HOŁYSZ; CHIBOWSKI, 2017).

A combinação de dois ou mais métodos também se apresenta como uma possibilidade de síntese. Essa combinação tem como objetivo obter hidroxiapatitas com melhores propriedades, como por exemplo, combinações de hidrotérmico-mecanoquímico, hidrotérmico-hidrólise, hidrotérmico-microemulsão (DING *et al.*, 2015).

O Quadro 7 apresenta pesquisas realizadas com diferentes métodos de síntese de Hidroxiapatita.

Quadro 7 – Métodos de síntese de Hidroxiapatita.

Técnica utilizada	Autor	Materiais e métodos
Via úmida	Viana <i>et al.</i> (2020)	$Ca_{10}(PO_4)_2(OH)_2 + 6H_2O$
Via úmida	Gomes <i>et al.</i> (2012)	HCl com conversão para $Ca(OH)_2$ e reação com $H_3PO_4$ HCl com reação com $Na_2HPO_4$ $HNO_3$ e reação com $H_3PO_4$ $H_3PO_4$ sobre a casca de ovo
Via úmida	Volkmer (2006)	Ácido-base Reação de $H_3PO_4$ e $Ca(OH)_2$ . Secagem em estufa
Via úmida	Dalmônico <i>et al.</i> (2015), Santos (2022), Rigo (2007), Soares (2006), Silva (2007) e Camargo (2000)	Síntese dos pós nanoestruturados de fosfato de cálcio, através da reação de dissolução-precipitação de $CaO + H_2O + H_3PO_4$
Via úmida	Kothapalli (2004)	$Ca(NO_3)_2 + (NH_4)_2PO_4$ $Ca(OH)_2 + H_3PO_4$
Hidrotérmica	Demers (2001), Sivakumar (1996), Elliot (1994), Hata (1983) e Ioku (1988)	Síntese hidrotérmica sob alta pressão. Soluções contendo cálcio e fosfatos
A partir de meio aquoso	Wang (2009), Afshar (2003), Kong (2002), Aoki (1994), Langstaff (1999) e Raynaud (2002)	Reação por precipitação, utilizando $Ca(NO_3)_2$ e $(NH_4)_2HPO_4$
Sol-Gel	Rajabi, 2008	$Ca(NO_3)_2$ ; $H_2O$ ou etanol, $P_2O_5$ , ou $H_3PO_4$
Sol-Gel	Waheed <i>et al.</i> (2015)	$H_3PO_4$ e hidróxido de cálcio $[Ca(OH)]_2$

Fonte: Adaptado de Silva (2012).

Pelo fato de apresentarem uma elevada porosidade, que pode variar de 10% a 80%, e cristalinidade, as nanopartículas de Hidroxiapatita não apresentam toxicidade e são biocompatíveis, tornando-as de grande atração para pesquisas relacionadas ao sistema de liberação e controle de fármacos. Desta forma, a nano Hidroxiapatita é utilizada principalmente como sistema de administração de drogas em doenças ósseas, especialmente em ortopedia e odontologia para regeneração de tecido ósseo (SZCZEŚ; HOŁYSZ; CHIBOWSKI, 2017).

Os experimentos de proliferação celular L929 têm demonstrado que nanopartículas de Hidroxiapatita são mais biocompatíveis do que as hidroxiapatitas disponíveis a nível comercial (FU *et al.*, 2008). Os nano cristais de hidroxiapatita apresentam um material com a osteocondutividade aprimorada. Além disso, as funções do osteoblasto aumentam juntamente com a biocompatibilidade (CAI *et al.*, 2015)

## 2.5 BIOCIMENTOS

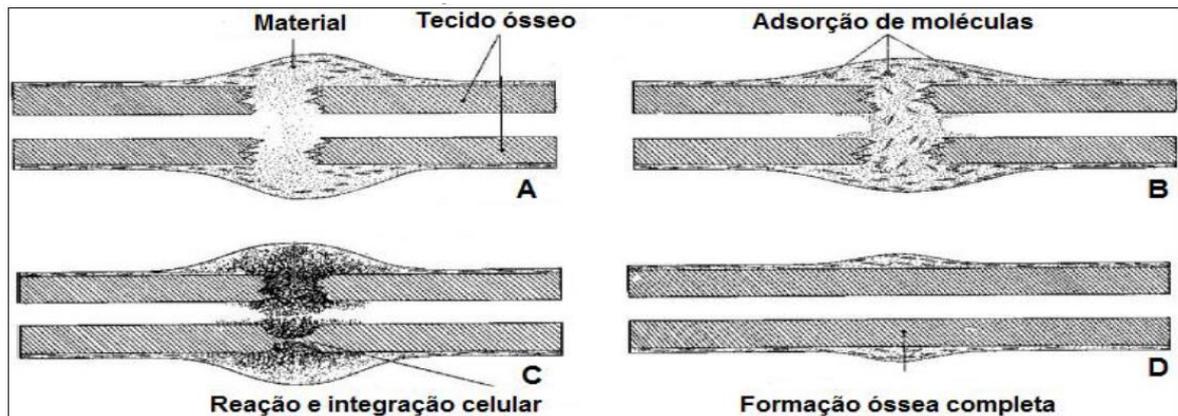
Os cimentos de fosfatos de cálcio (CFC) foram desenvolvidos no início dos anos 80. Gruninger *et al.* (1984), constataram que ao misturar fosfato de cálcio em soluções aquosas, forma-se uma pasta viscosa; esta pasta quando implantada dentro do organismo endurece formando brushita, hidroxiapatita, hidroxiapatita pobre em cálcio e fosfato de cálcio amorfo. O material formado quando implantando é reabsorvido pelo organismo originando um novo tecido ósseo (CAMARGO; SOARES; GEMELLI, 2007; MACHADO, 2007).

Os CFCs possuem alta biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade, facilidade de moldagem e manipulação (RABIEE, 2013) (LOURENÇO, 2016).

Uma desvantagem na utilização do CFC's é a baixa resistência mecânica, mecânica, que no melhor dos casos, consegue igualar-se a do osso trabecular, ou de um quinto do osso cortical, além da lenta reação de cura (DOS SANTOS *et al.*, 2002). A utilização de materiais com alta resistência à compressão é necessária para estabilização de fraturas ósseas (LOURENÇO, 2016). Desta forma, podem ser inseridos aditivos em sua síntese visando um material com melhores propriedades; dentre esses pode-se destacar a sílica.

Os cimentos de fosfatos de cálcio têm sido aplicados como possíveis substitutos ósseos e, dessa forma, despertando grande interesse na comunidade científica (BOHNER, 2000). Com o objetivo de melhor explicar as interações entre o biocimento e o tecido ósseo, a Figura 8 ilustra esse processo.

Figura 8 – Reações do tecido ósseo na interação com o biocimento: (a) preenchimento com biocimento, (b) adsorção do biomaterial, (c) neoformação óssea e (d) formação óssea completa.



Fonte: Oréfice, Pereira e Mansur (2012).

Na Figura 8, a ilustração A demonstra o preenchimento da cavidade óssea com a pasta de biocimento; na ilustração B ocorre a adsorção e conseqüentemente a ligação do biomaterial com o tecido ósseo; na C ocorre a neoformação óssea, resultado da interação da osseoindução e óssea integração de biomaterial com tecido ósseo. Finalmente na imagem D, a formação do novo tecido ósseo (ORÉFICE; PEREIRA M. M.; MANSUR, 2012). Os cimentos de fosfato de cálcio em escala nanométrica apresentam uma alta área superficial, que favorece a molhabilidade e hidratação, acelerando dessa forma o tempo de endurecimento do material (YUASA *et al.*, 2004).

Os biocimentos de fosfato de cálcio (CPC) são muito utilizados como carregadores de medicamento. Eles formam pastas injetáveis prontas para uso, dispersando-se o pó de cimento em um solvente miscível em água, como por exemplo glicerina ou polietileno glicol. Estes cimentos são carregados com medicamentos para o tratamento de patologias ósseas (VORNDRAN *et al.*, 2013).

Atualmente, as pesquisas relatam a existência de diferentes biocimentos de fosfatos de cálcio, que podem ser sintetizados por meio de diferentes métodos. Os

tipos mais conhecidos são: o fosfato de cálcio- $\beta$  (TCP- $\beta$ ), a hidroxiapatita (HA) estequiométrica e brushita (ALMEIDA, 2018; FRAN CZAK *et al.*, 2017; SAVICKI *et al.*, 2019).

Para a obtenção de um biocimento, necessita-se de um tratamento térmico e se a temperatura for superior a 1200 °C, esse tratamento pode levar à transformação da fase fosfato de cálcio, que ocorre em aproximadamente 1180 °C, por meio da dissociação do CaO da fase hidroxiapatita. No processo de tratamento térmico para obtenção do biocimento, ocorre a liberação de CaO pela desestabilização da fase hidroxiapatita, formando desta maneira novas fases (KARVAT *et al.*, 2005).

O processo de hidratação dos biocimentos ocorre em presença de água ou do plasma sanguíneo, formando desta formando uma pasta, por meio de uma reação exotérmica, que pode alcançar temperaturas acima de 37 °C. Esta reação evolui para o endurecimento da massa do biocimento pela sua saturação (DOS SANTOS; PINTO, 2011).

Na pega ocorre o desenvolvimento de formação da rede cristalina, que inicialmente apresenta-se fraca; no processo de endurecimento ocorre o desenvolvimento de uma estrutura cristalina mais estável e irreversível. (FRAN CZAK *et al.*, 2017). O estágio do tempo de pega está relacionado ao tempo de trabalho, ou seja, o tempo disponível para a aplicação *in situ*. (DOS SANTOS; PINTO, 2011; FRAN CZAK *et al.*, 2017)

A adição de segunda fase no biocimento acaba por formar grãos finos que durante o processo de hidratação e pega formam uma microestrutura porosa. Essa adição de uma segunda fase na matriz fosfato de cálcio melhora a capacidade de molhabilidade, capilaridade, hidratação e pega do biocimento bifásico. Esta estrutura é microporosa e favorece a adesão e proliferação de osteoblastos. Além disso, uma segunda fase presente num biocimento de fosfato de cálcio pode alterar o arranjo cristalino da fase hidroxiapatita, com alteração dos parâmetros de rede cristalina; esta alteração leva à modificação de sua solubilidade (FRAN CZAK *et al.*, 2017).

### **2.5.1 Biocimentos: Estado da Arte**

As pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de biocimentos são realizadas desde os anos 90 e utilizam biocimentos de fosfato de cálcio para a liberação de fármacos. Boa parte dos estudos está relacionado a utilização de

antibióticos pela sua aplicação na prevenção de infecções e no tratamento de infecções ósseas (SILVA, 2018).

A liberação *in vitro* de cefalexina e norfloxacin em um biocimento de Hidroxiapatita foi o primeiro estudo a propor a incorporação de medicamentos em biocimentos de fosfatos de cálcio (OTSUKA *et al.*, 1994).

Gong *et al.* (2016) prepararam um cimento de silicato de fosfato de cálcio no tratamento de osteoporose. Para o desenvolvimento do biomaterial foram utilizados pó de silicato de cálcio, fosfato de monocálcio e risedronato sódico. O fosfato e o risedronato sódico, foram adicionados ao pó de silicato de cálcio para a formação de uma argamassa. As pastas de cimento foram moldadas em cilindros de poliestireno de 17 mm x 2 mm. Os cimentos de silicatos de cálcio desenvolvidos foram afetados pela maior concentração de risedronato sódico que impediram a hidratação do cimento. Nos testes em animal, a adição do cimento reduziu significativamente a osteoporose.

Schumacher *et al.* (2017) desenvolveram um compósito de cimento ósseo de hidroxiapatita e grânulos de vidro bioativo mesoporoso. As propriedades mecânicas do compósito não foram comprometidas. Foram liberadas duas proteínas no vidro bioativo, que puderam ser controladas quando foram carregadas pelos grânulos de vidro. As proteínas também demonstraram manter sua atividade biológica durante a incorporação e liberação do composto. Essa pesquisa sugere que o compósito de cimento de Fosfato de Cálcio e vidro bioativo seja uma importante plataforma de entrega de medicamentos.

Roobahani, M. *et al.* (2017) desenvolveram cimento de fosfato de nano-cálcio e avaliaram o efeito nanométrico nas propriedades mecânicas, físicas e de manuseio, que envolvem injetabilidade e tempo de pega. A pesquisa utilizou uma proporção de 98% fosfato tricálcico e 2% hidroxiapatita que foram aplicados como a fase de pó. Uma solução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  foi usada como fase líquida do cimento. O material desenvolvido apresentou propriedades mecânicas e biológicas adequadas, tornando-se dessa forma um candidato desejável para preencher defeitos ósseos.

Van Houdt *et al.* (2018) criaram compósitos usando cimento de fosfato de cálcio numa proporção de 60% e ácido polilático-coglicólico em proporção de 40%. Estes foram carregados com alendronato sódico. Os resultados *in vitro* mostraram que os compósitos carregados com alendronato sódico apresentaram propriedades

cl clinicamente adequadas, incluindo tempos de presa, resistência à compressão apropriada e liberação controlada de alendronato sódico.

A utilização de cimentos de fosfato de cálcio na área de biomateriais apresenta como principais vantagens a autofixação, injetabilidade, plasticidade, compatibilidade com defeitos ósseos (ROOZBAHANI; KHARAZIHA, 2019).

Destaca-se nos últimos anos a evolução dos CFCs injetáveis, utilizados para defeitos ósseos; eles possuem aplicações clínicas na área de implantes, além de auxiliar no processo de fixação de implantes ortopédicos e enxertos. A pasta do biocimento injetável é usada para correção de defeito em áreas envolvendo cavidades estreitas com acessibilidade limitada por meio de técnica minimamente invasiva (ARKIN *et al.*, 2021);

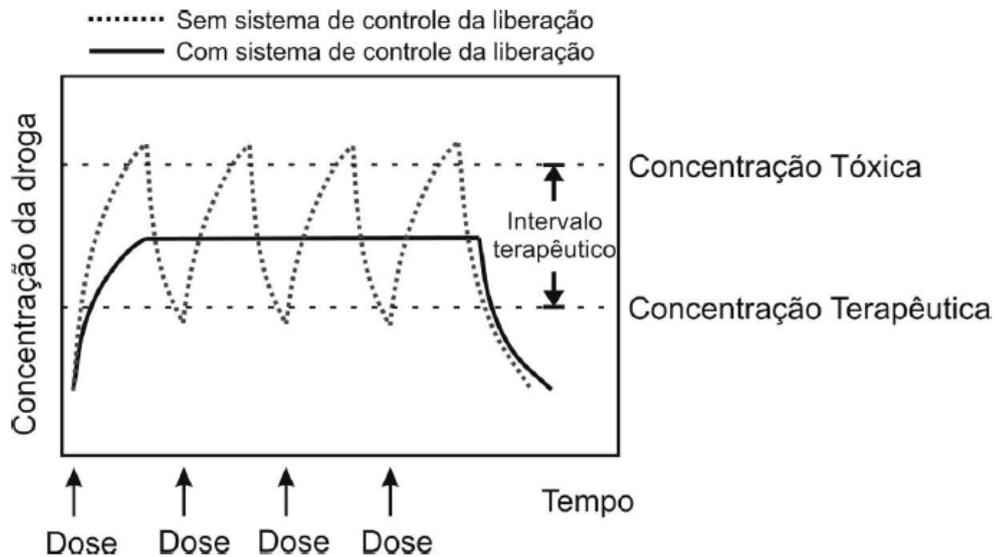
## 2.6 ENTREGA DE MEDICAMENTOS (*DRUGS-DELIVERY*)

Os medicamentos são substâncias desenvolvidas para prevenir, curar ou aliviar doenças, como também são utilizadas para corrigir ou reparar as consequências geradas por outros medicamentos. Desta forma, existem diversas substâncias para diversos fins, entre eles: analgésicos, antibióticos e anti-inflamatórios, relaxantes musculares. Um fator preponderante é que todos eles compartilham três parâmetros: a dose a ser administrada, o tempo entre as doses e o tempo total de uso. Diante desse fato, qualquer alteração em um parâmetro pode corresponder a um dano ao paciente (VALLET-REGÍ e ARCOS, 2013).

O desenvolvimento de um dispositivo de entrega de liberação controlada de medicamentos consiste na combinação de um material com um medicamento terapêutico específico, permitindo que este seja liberado adequadamente no organismo ou local do tratamento (GINEBRA *et al.*, 2012).

A entrega controlada de medicamentos tem sido alvo de pesquisas recentes na área de ciência dos materiais biomédicos, pois tornou-se uma ferramenta essencial para melhorar as terapias (YOO; LEE, 2006).

Figura 9 – Liberação de medicamentos convencional x controlada.



Fonte: Peppas *et al.* (2000).

Na Figura 9 é possível observar a liberação de medicamento em relação ao tempo e dosagem para a liberação convencional e controlada. Pode-se observar que quando não há um controle de liberação, o medicamento é inserido sempre de forma abrupta, com picos de liberação do medicamento, caracterizando uma concentração tóxica de medicamento ao organismo, como demonstrado na imagem. Em contrapartida quando a liberação do medicamento é realizada por meio de um sistema com controle de liberação o comportamento da entrega é diferente. Pode-se observar que há um pico inicial de entrega de medicamento, que é importante no tratamento inicial; porém após esse pico a liberação do medicamento é estabilizada, caracterizando uma entrega controlada, denominada concentração terapêutica. Neste cenário, a liberação controlada pode garantir maior eficácia da ação terapêutica.

A administração de dextroanfetamina, em 1952 é conhecida como a primeira formulação de entrega de medicamentos. Desta data até o ano de 1970, o controle de entrega de medicamentos utilizava diferentes mecanismos, que incluíam dissolução, difusão, osmose e troca iônica (PARK, 2014).

O sistema de medicamentos apresenta-se em três gerações (PARK, 2014):

- A primeira geração utilizou sistemas de administração oral que variavam em uma ou duas vezes ao dia;
- A segunda geração as pesquisas estavam direcionadas a sistemas de entrega de pedido zero. Essa tese era utilizada pelo fato de manterem uma

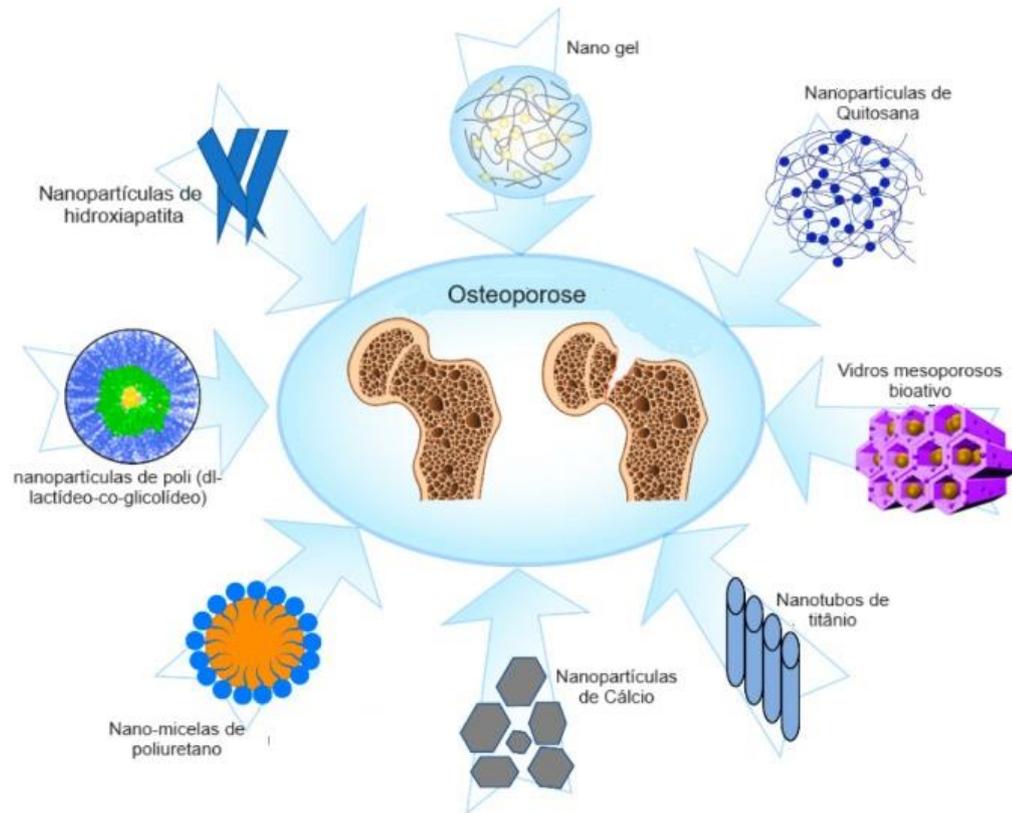
concentração estável da droga no sangue. Depois de uma década observaram que essa técnica não era necessária, pelo fato da liberação de ordem zero não manter a concentração de droga no sangue. Ainda nessa geração outros sistemas foram desenvolvidos, como polímeros inteligentes, que realizavam a entrega quando acionados por meio de fatores ambientais (pH, temperatura);

- A terceira geração de liberação de medicamentos ainda está em desenvolvimento. Contudo nos últimos 30 anos foram produzidas diferentes pesquisas nesta área; o campo mais difundido no meio científico aponta para pesquisa que utilizam nanopartículas. Os pesquisadores têm um outro desafio que é a redução dos efeitos colaterais do medicamento, que é tão importante quanto liberar uma quantidade maior do medicamento no local desejado (PARK, 2014).

Esses sistemas de administração de medicamentos apresentam-se como uma nova abordagem, com o intuito de aumentar a eficácia terapêutica, reduzindo os efeitos colaterais dos tratamentos tradicionais. (SAVICKI; ALMEIDA CAMARGO; GEMELLI, 2020).

Os sistemas de liberação de medicamentos são utilizados em diversas áreas como: biomédica e farmacêutica. Neste último caso, administração de fármacos, vacinas com imunogenicidade prolongada, suplementação nutricional, reposição hormonal e em contracepção. Além destes, existem estudos aplicados a área de medicina veterinária e a agricultura (GINEBRA *et al.*, 2012).

Figura 10 – Principais nanomateriais nos sistemas de liberação de fármacos para osteoporose.

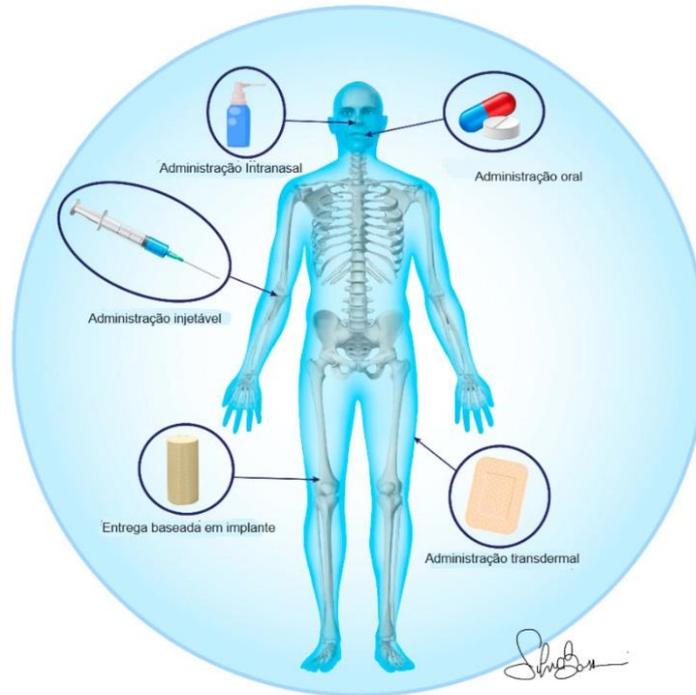


Fonte: Salamanna *et al.* (2021).

Salamanna *et al.* (2021) realizaram uma revisão sistemática sobre os sistemas de administração de medicamentos contra osteoporose utilizando biomateriais. Na pesquisa realizada, destacam-se no sistema de liberação de fármacos os seguintes nanomateriais: hidroxiapatita, quitosana, vidro ativo mesoporoso, nanotubos de titânio, poliuretano e polilactídeo-coglicólido, conforme pode-se observar na Figura 10.

As principais abordagens para administração de medicamentos para o tratamento de osteoporose incluem utilização de nano biomateriais, como: estudos pré-clínicos *in vivo*, administração injetável, administração baseada em implante, administração oral, administração transdérmica, entrega e entrega intranasal. A Figura 11 apresenta a forma como os biomateriais são utilizados para auxiliar na administração de medicamentos.

Figura 11 – Principais formas de administração de medicamentos para osteoporose com biomateriais.



Fonte: Salamanna *et al.* (2021).

### 2.6.1 Entrega de medicamentos com cimentos de fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio são matrizes que apresentam resultados favoráveis no que se refere ao carregamento de medicamentos para liberação de drogas. Essa forma de carregamento tem-se destacado no tratamento de osteomielite e osteoporose (VALLET-REGÍ; ARCOS, 2013).

Sistemas de liberação de medicamentos utilizando fosfato de cálcio têm sido estudados em doenças ósseas. Cabe ressaltar que cada sistema possui algumas particularidades, que dependem das características físicas e químicas dos biomateriais e da interação medicamentosa (SAVICKI; ALMEIDA CAMARGO; GEMELLI, 2020).

Os métodos mais conhecidos no carregamento de medicamentos por biocerâmicas de fosfatos de cálcio são: alto vácuo, impregnação e formação de gel (SAVICKI *et al.*, 2019):

- Impregnação: A impregnação acontece pela interação física ou química do material com o medicamento. O medicamento encontra-se imerso em uma solução e é adicionado o biomaterial (MARQUES *et al.*, 2016);
- Alto vácuo: O medicamento e o biomaterial são inseridos em uma solução, e aplica-se o alto vácuo até a remoção do solvente (SHAO *et al.*, 2012);
- Formação de gel: o medicamento é adicionado antes da formação do gel, que é processado em temperaturas inferiores a degradação do medicamento (VALLET-REGÍ; ARCOS, 2013).

Visando prevenir ou recuperar parte da perda óssea de pacientes, nos últimos anos tem-se intensificado o estudo pelo tratamento com sistemas de liberação de drogas. Este sistema deve incluir uma quantidade suficiente da substância ativa e ter uma liberação sustentada; dessa forma, permitindo o efeito desejado no tratamento terapêutico (NEAMTU *et al.*, 2017).

A Hidroxiapatita tem sido utilizada como matriz eficaz para o encapsulamento e liberação controlada de medicamentos, devido a sua semelhança com o tecido ósseo (VALLET-REGÍ; ARCOS, 2013).

As sílicas, por sua vez, geralmente são utilizadas combinadas com outros materiais, com o intuito de sintetizar um material com as propriedades necessárias para o carregamento de medicamentos (LOURENÇO, 2016).

Os biocimentos são muito indicados como meios de transporte de medicamentos e novos estudos vem sendo realizados com intuito de melhorar as propriedades desses biomateriais, buscando a ampliação de sua utilização no campo de liberação controlada de fármacos (YU *et al.*, 2010).

#### 2.6.1.1 Medicamentos para regeneração óssea

Diversas substâncias medicamentosas são incorporadas em bisfosfonatos de cálcio; entre estas, as mais estudadas são anti-inflamatórios e antibióticos. Destacam-se o alendronato sódico e o risedronato sódico, medicamentos utilizados em tratamentos patológicos que envolvem perda de massa e densidade óssea (PARENT *et al.*, 2017).

A utilização de biomateriais associados a esses medicamentos, constituem-se como uma alternativa quando a fratura estiver instituída, tendo em vista

que na osteoporose a fratura é responsável pela alta morbidade, com elevada chance de mortalidade (ARAÚJO, 2018).

#### 2.6.1.1.1 Alendronato sódico

Os bisfosfonatos são drogas que formam forte ligações com o tecido ósseo, além de inibir a reabsorção óssea, cujo principal mecanismo de ação está relacionado à diminuição da atividade osteoclástica. O alendronato sódico é um bisfosfonato que apresenta como característica maior potência de ação, quando comparado aos bisfosfonatos das gerações anteriores. Uma das principais indicações do uso do alendronato sódico é no tratamento da osteoporose, na osteólise induzida por tumores, na hipercalcemia e na doença de Paget (FERNANDES *et al.*, 2013).

Entretanto como todo fármaco o alendronato de sódico pode resultar em algumas reações adversas ao organismo, como: apresentar distúrbios digestivos, náusea, vômito, além de irritabilidade.

Diversos trabalhos publicados relatam que o alendronato sódico, como os demais bisfosfonatos, ligam-se fortemente aos cristais de Hidroxiapatita do osso, especialmente nos pontos de ativo remodelamento ósseo (FERNANDES; FAIGLEITE; CARVALHO, 2004).

O composto formado por Hidroxiapatita e alendronato sódico pode ser funcionalizado como dispositivo de administração local de drogas com efeitos colaterais reduzidos. O longo período de liberação do fármaco melhora a eficácia do alendronato sódico no tratamento de patologias óssea (NEAMTU *et al.*, 2017).

Özer *et al.* (2017) realizaram um estudo com enxertos em ramo mandibular de coelhos, envolvendo a utilização de alendronato sódico. Nas 4 semanas após o enxerto, foi possível evidenciar maior permanência de enxerto a longo prazo, provando desta forma que o fármaco melhora a capacidade osteocondutora, além de permitir que o medicamento permaneça mais tempo no defeito ósseo, favorecendo a ossificação do defeito ósseo.

Pura, Boby e Tanzer (2016) estudaram a liberação local de alendronato sódico em implantes revestidos. Seus estudos demonstraram uma melhora geral na aposição óssea e no osso peri-implante. A comparação dos implantes dosados com alendronato sódico, revestidos de HPA, mostrou que a dose intermediária de 0,06 mg/cm<sup>2</sup> de alendronato sódico teve o maior efeito na formação óssea.

Garbuz *et al.* (2008) avaliaram o efeito do tântalo poroso revestido com alendronato sódico, na formação óssea em um modelo animal incorporando um espaço entre o implante e o osso. A porcentagem do comprimento do implante que estava em contato com o novo osso com o revestimento de fosfato de cálcio e alendronato sódico aumentou em média 804%, em comparação com a porcentagem no grupo tratado com implantes não revestidos. O estudo demonstrou preenchimento significativamente melhor da lacuna osso-implante e crescimento ósseo em associação com os implantes de tântalo porosos revestidos com fosfato de cálcio e alendronato sódico.

#### 2.6.1.1.2 Risedronato sódico

Além do alendronato sódico citado, outro fármaco da classe dos bisfosfonatos cuja ação mostra-se muito eficaz na osteoporose é o risedronato sódico. Ele é um piridinil bisfosfonato que foi desenvolvido para o tratamento e prevenção da osteoporose (PIAI *et al.*, 2005).

Santhosh *et al.* (2019) corroboraram com Piai *et al.* (2005), salientando que o risedronato sódico tem sua utilização focada no fortalecimento e prevenção dos ossos, além do tratamento da osteoporose e da doença óssea de Paget.

O risedronato sódico tem como característica a solubilidade em água e como já destacado, pode ser utilizado no tratamento da osteoporose por inibir a reabsorção óssea assistida por osteoclastos.

Estudo recente aponta que o risedronato sódico pode reduzir a reabsorção do osso trabecular e do osso cortical, alterando a espessura e a porosidade cortical, que é uma das principais causas de fraturas em idosos (EL-WAKIL *et al.*, 2022).

Em contrapartida, apesar de ser um ótimo fármaco para tratamento da osteoporose, o risedronato sódico apresenta baixa biodisponibilidade oral (0,68%), além disso, quando administrado dessa forma, pode apresentar algumas reações adversas ao organismo como: constipação, dispepsia, náusea, dor abdominal e diarreia em razão de sua natureza altamente hidrofílica. Essas características justificam a pesquisa na utilização de materiais que possam realizar a entrega deste fármaco no local da patologia (ELNAGGAR *et al.*, 2019).

Uma pesquisa foi realizada testando em ratos adultos o efeito de risedronato sódico durante 17 dias por via subcutânea. O estudo demonstrou que o

medicamento ocasionou redução estatisticamente significativa na taxa de aposição mineral. Neste estudo, os autores concluíram que o medicamento supriu significativamente a formação óssea e apresentaram efeito na atividade osteoblástica (ROCHA, 2013).

### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Esta etapa de pesquisa descreve os procedimentos que foram utilizados para obtenção de compósitos de cimentos de fosfatos de cálcio com adição de nanopartículas de sílica para entrega de fármacos na regeneração óssea. Para a obtenção destes materiais foram utilizadas nanopartículas de sílica sintetizadas por duas rotas distintas. Na rota 1 a sílica foi sintetizada por meio do método Stöber (STÖBER; FINK; BOHN, 1968), enquanto na rota 2 foi sintetizada por meio de uma adaptação do método Stöber proposta por Doadrio *et al.* (2017). Os medicamentos selecionados para a pesquisa foram o alendronato sódico e o risedronato sódico.

#### 3.1 MATERIAIS

Nesta etapa do projeto serão descritos os materiais utilizados para obtenção do biomaterial.

##### 3.1.1 Nanopartículas de sílica

Para a síntese das nanopartículas de sílica da rota 1, foram utilizados os reagentes: etanol absoluto, ortosilicato de tetraetila (TEOS), hidróxido de amônia (NH<sub>4</sub>OH) e água destilada.

O etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) utilizado na pesquisa foi da empresa Êxodo Científica, lote AE30970RA, com pureza de 99,5%.

O ortosilicato de tetraetila utilizado para a síntese das nanopartículas de sílica foi da empresa Sigma-Aldrich, lote WXBC6091V, com pureza de 98%.

O hidróxido de amônia utilizado foi da Química Moderna, lote 00896.

Para o desenvolvimento da síntese das nanopartículas de sílica da rota 2 foram utilizados os seguintes materiais: água destilada, TEOS, surfactante brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB), hidróxido de amônia (NH<sub>4</sub>OH), etanol absoluto e ácido clorídrico.

O ortosilicato de tetraetila utilizado para a síntese das nanopartículas de sílica foi da empresa Sigma-Aldrich, lote WXBC6091V, com pureza de 98%.

O surfactante brometo de cetiltrimetilamonio utilizado foi da empresa J. T. Baker, lote 0000056939, com pureza de 98%.

O hidróxido de amônia utilizado como catalisador foi o da Química Moderna, lote 00896.

O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) utilizado na pesquisa foi da empresa Êxodo Científica, lote AE30970RA, com pureza de 99,5%. O etanol atua como solvente e estabilizante na hidrólise.

O ácido clorídrico utilizado para síntese da sílica mesoporosa foi da empresa Fmaia com concentração de 37%. Este material atua também como catalisador na suspensão.

### **3.1.2 Síntese de biocimento de hidroxiapatita**

Para a realização da síntese do biocimento de fosfato de cálcio, foram utilizados o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), o ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e água destilada. Para hidratação do biocimento foi utilizado uma solução de fosfato dissódico.

Na realização desta pesquisa, foi utilizado o pó de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), da empresa LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, lote n° 241634, com concentração de 99%.

O ácido fosfórico que foi utilizado para a síntese de hidroxiapatita é da LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, lote n° 239882, com concentração de 85%.

O fosfato dissódico utilizado para a preparação da pasta de biocimento foi da empresa NUCLEAR, Lote: 00-00101718 com concentração de 98 a 100%.

### **3.1.3 Medicamento**

Para a realização da pesquisa, foram utilizados os medicamentos alendronato sódico e risedronato sódico. O alendronato sódico utilizado foi da empresa Inifinity Pharma, com a fórmula química  $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{NNaO}_7\text{P}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , com peso molecular de 325,12 g/mol e densidade de 0,349 g/mL. Enquanto o risedronato sódico foi utilizado o medicamento Fixenato da Germed farmacêutica de 35 mg, com fórmula química  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NNaO}_7\text{P}_2$ , com peso molecular de 305,09 g/mol.

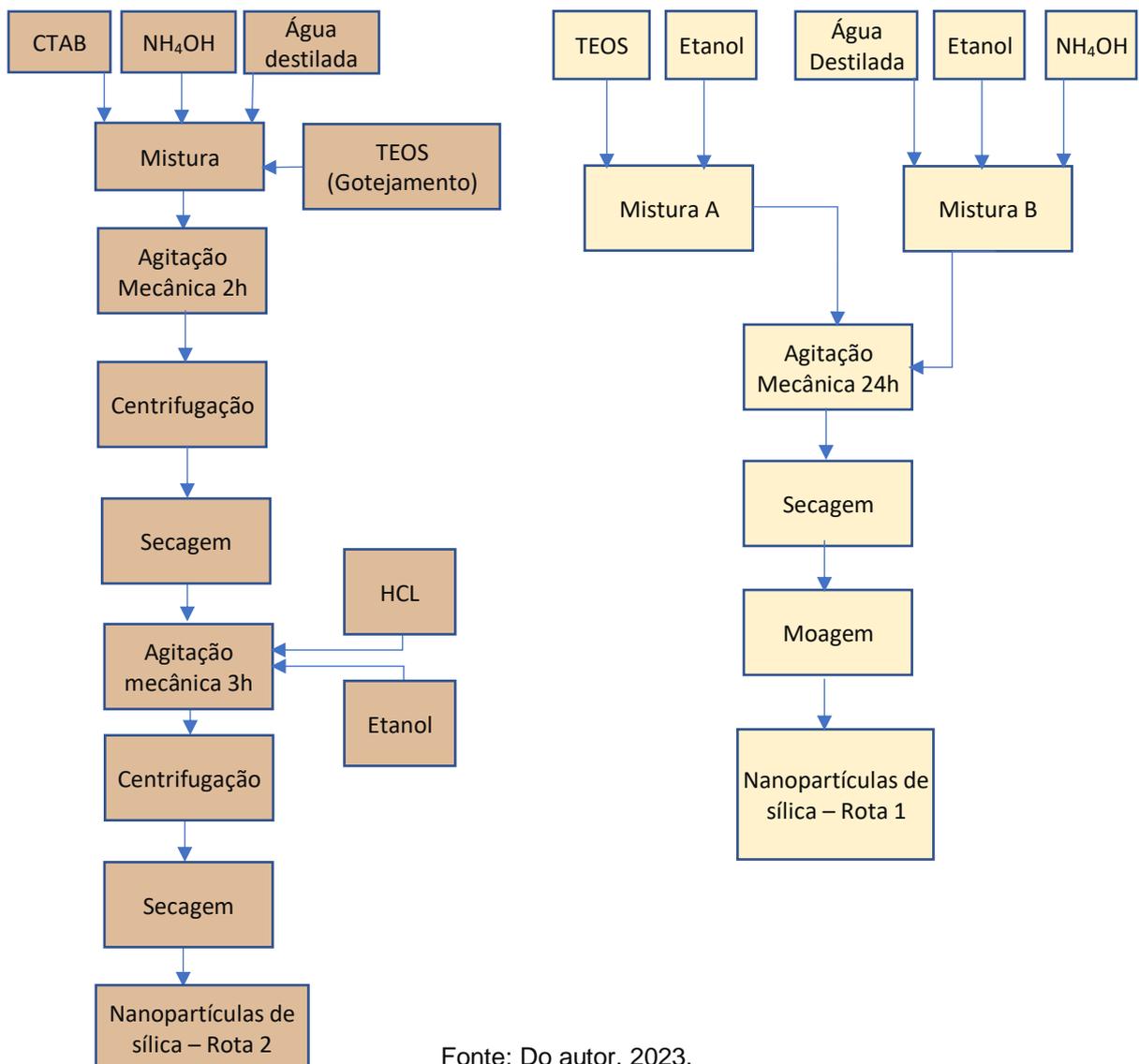
### 3.2 MÉTODOS

Nesta seção são descritos todos os métodos que foram utilizados para a realização das sínteses e caracterizações dos biocimentos e experimentos laboratoriais.

#### 3.2.1 Síntese das nanopartículas de sílica

A Figura 12 apresenta o fluxograma do procedimento experimental para obtenção das nanopartículas de sílica obtidas.

Figura 12 – Fluxograma da síntese das nanopartículas de sílica (rota 1 e 2).



Fonte: Do autor, 2023.

### 3.2.1.1 Síntese das nanopartículas de sílica na rota 1

Para a realização da síntese das nanopartículas de sílica da rota 1 foi utilizado o método STÖBER (STÖBER; FINK; BOHN, 1968). Foram preparadas duas soluções que foram nomeadas A e B. Na solução A foram homogeneizados 0,039 mol de TEOS com 0,235 mol de etanol absoluto que foram inseridos em um Erlenmeyer com agitação mecânica (Agitador magnético com aquecimento Fisatom 752A) com um leve aquecimento a 30 °C. A solução B foi preparada em um béquer de 1 L com 0,294 mol de água e 0,235 mol de etanol e 0,005 mol NH<sub>4</sub>OH. Quando pronta, a solução B foi adicionada ao Erlenmeyer com a solução A e mantida em agitação de 700 RPM por 24 h a 30 °C (ZANONI *et al.*, 2019).

### 3.2.1.2 Síntese das nanopartículas de sílica na rota 2

A rota para a síntese de sílicas estabelecidas pela rota 2, foi desenvolvida adaptando o método Stöber, como base na pesquisa de Doadrio *et al.* (2017).

Inicialmente, a vidraria a ser utilizada foi limpa com uma solução aquosa 2% de ácido fluorídrico para remoção dos resquícios de contaminação. Em um béquer de 1 L colocou-se 0,002746 mol de CTAB e 480 mL de água destilada, que foram inseridos em uma proveta de 500 mL. Em um erlenmeyer de 1 L, 0,002746 mol de CTAB e os 480 mL de água foram adicionados. Logo em seguida foi adicionado à mistura no Erlenmeyer em agitação mecânica, com o auxílio de uma pipeta graduada, 3,9 mL de hidróxido de amônia. A mistura foi agitada e aquecida até 80 °C. Posteriormente, 5 mL de TEOS foram adicionados a mistura gota-a-gota usando um conta-gotas com velocidade de adição de ~1 gota/s.

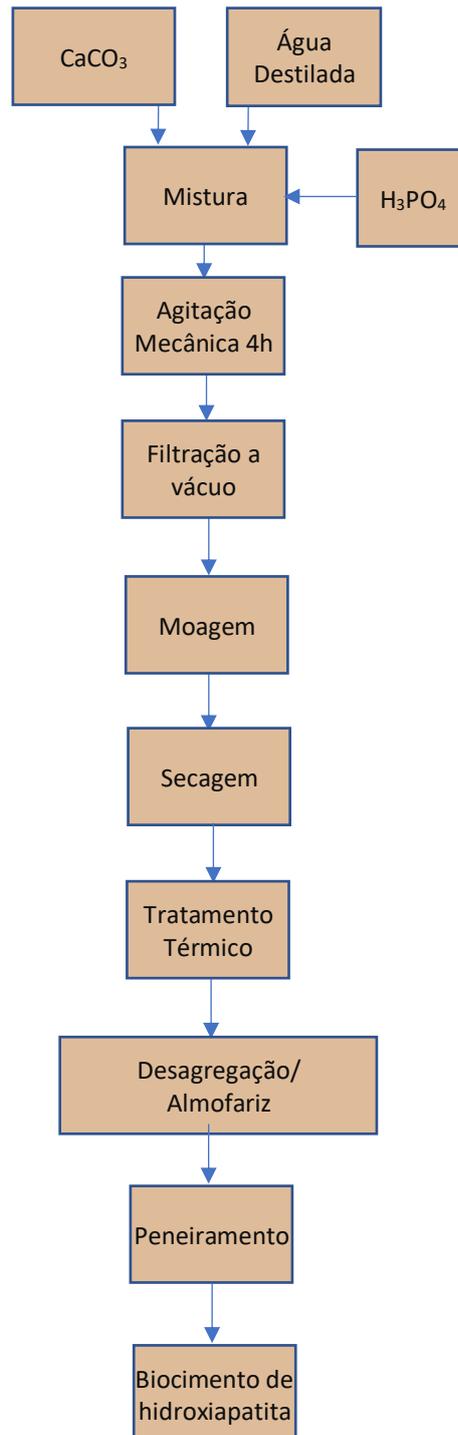
A mistura ficou sob agitação a 80 °C por 2 h. Após esse período foi observado a formação de um precipitado branco. O precipitado foi extraído da mistura por centrifugação e lavado com uma mistura contendo 50% água destilada e 50% etanol e posteriormente seco em estufa.

Para a remoção do surfactante o material foi disperso em 100 mL de solução 0,5 M de HCl em etanol. O procedimento foi realizado sob agitação magnética por 3 h a ~50 °C. As nanopartículas de sílica mesoporosas foram recolhidas por centrifugação e lavadas 3 vezes com água e etanol e posteriormente seco em estufa a 80 °C (DOADRIO *et al.*, 2017).

### 3.2.2 Síntese do biocimento

A Figura 13 apresenta o fluxograma do procedimento experimental para obtenção do biocimento de hidroxiapatita.

Figura 13 – Fluxograma da síntese do biocimento de Hidroxiapatita.



Fonte: Do autor, 2023.

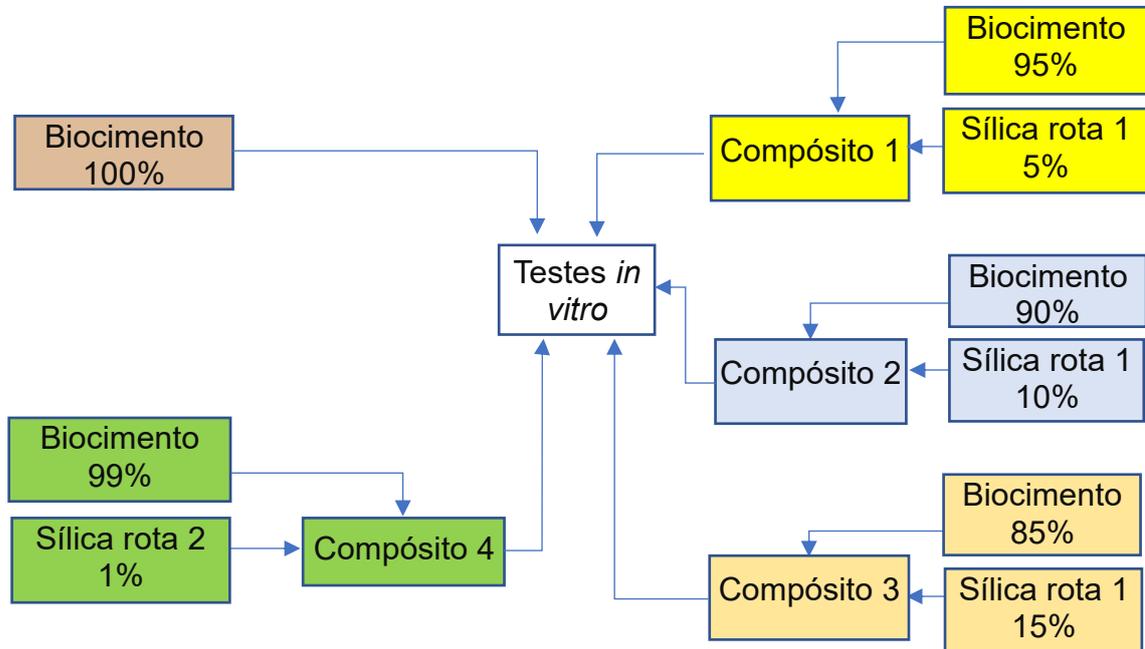
A síntese úmida foi desenvolvida com base na metodologia usada por Silva (2018). Primeiro, o pó de carbonato de cálcio foi adicionado lentamente a um béquer contendo 250 mL de água destilada sob agitação mecânica (agitador magnético Fisatom, 713D). Em seguida, o ácido fosfórico foi adicionado por gotejamento usando a concentração molar já estabelecida de Ca/P desejada para a formação bifásica (hidroxiapatita/TCP). Essa mistura foi mantida por 4 h, com controle de pH a cada 20 min. Posteriormente a suspensão foi filtrada a vácuo (PRISMATEC) usando um filtro C41 de faixa preta. Após a passar pelo filtro, o pó resultante foi colocado em um moinho atritor (Netzsch, PE 075) por 1 h para completar o processo de síntese. Em seguida, o material foi colocado para secagem por 24 h em um forno a 70 °C; após esse período o pó seco foi desaglomerado com um almofariz e pistilo; posteriormente passado por uma peneira de 150 µm e tratado termicamente a 900 °C por 2 h para estabilizar as fases cristalinas formadas.

Para a obtenção do biocimento, o pó seco foi retirado da estufa e sofreu um tratamento térmico a 1300 °C num forno mufla de alta temperatura da marca Fortelab série 1600 por 2 h. Após o tratamento térmico, o pó resultante foi desagregado com o auxílio de um almofariz e posteriormente passou pelo processo de peneiramento em peneira de 300 µm #325 (45 µm) (FRANCZAK *et al*, 2017).

### **3.2.3 Obtenção dos Compósitos**

Na Figura 14 é apresentado o fluxograma que ilustra a obtenção dos compósitos desenvolvidos.

Figura 14 – Fluxograma da obtenção do biocimento e dos compósitos com adição de nanopartículas de sílica.



Fonte: Do autor, 2023.

As cinco composições foram determinadas da seguinte forma:

1. 100% de Cimento de fosfato de Cálcio;
2. 95% de Cimento de fosfato de Cálcio + 5% nanopartículas de sílica rota 1;
3. 90% de Cimento de fosfato de Cálcio + 10% nanopartículas de sílica rota 1;
4. 85% de Cimento de fosfato de Cálcio + 15% nanopartículas de sílica rota 1;
5. 99% de Cimento de fosfato de Cálcio + 1% nanopartículas de sílica rota 2;

Com o objetivo de analisar o comportamento do material no que se refere ao comportamento mecânico, biológico e entrega de fármaco, foram preparadas cinco composições diferentes de biocimento. Neste trabalho essas composições foram denominadas biocimento (sem adição de sílica), compósito 1, 2, 3, e 4. Os compósitos receberam diferentes proporções de nanopartículas de sílica em sua massa total. Para cada composição, o medicamento foi introduzido a uma taxa de 1% em relação à massa total.

A composição 1 foi constituída de 100% de biocimento. Os compósitos 1, 2 e 3, foram constituídos respectivamente com 95, 90 e 85% de biocimento, variando proporcionalmente a adição de nanopartículas de sílica da rota 1, respectivamente de

5, 10 e 15% da massa total. Para o compósito 4 foi utilizado 99% de biocimento e 1% das nanopartículas de sílica obtida pela rota 2.

Para a realização da homogeneização mecânica, foi utilizado um almofariz e pilão conforme proposto Lourenço (2016). Informações detalhadas sobre a composição de cada compósito sintetizado são fornecidas na Quadro 8.

Quadro 8 – Amostras de compósitos de biocimento sintetizadas.

Composições	Biocimento	Nanopartículas de sílica – Rota 1	Nanopartículas de sílica – Rota 2
Biocimento	100%	-	-
Compósito 1	95%	5%	-
Compósito 2	90%	10%	-
Compósito 3	85%	15%	-
Compósito 4	99%	-	1%

Fonte: Do autor, 2023.

Conforme destacado anteriormente, a Quadro 8 apresenta a composição de cada biocimento desenvolvido na pesquisa.

### 3.2.4 Hidratação dos compósitos

Após a síntese dos pós de biocimento, eles passaram pelo processo de hidratação. Nesse processo, foi utilizada uma solução de fosfato dissódico. A hidratação do pó de biocimento com a solução de fosfato formou uma pasta cimentícia, que foi então transferida para um molde para preparar as amostras de teste. As amostras de teste foram preparadas em moldes em forma cilíndrica, cada um com aproximadamente 8 mm de diâmetro e 3 mm de altura.

Os ensaios de hidratação do biocimento ocorreram a uma razão líquido/pó igual a 0,7 mL/g. Desta forma, foram misturados 0,7 mL/g de solução contendo 4% de Fosfato Dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) para 1 g de biocimento.

O processo de cura do biocimento hidratado ocorreu de duas maneiras: primeiramente, as amostras foram curadas a seco em temperatura ambiente, e em segundo lugar, as amostras foram colocadas em frascos hermeticamente fechados com 10 mL de água destilada em uma estufa com temperatura controlada a 37,5 °C.

## **4 CARACTERIZAÇÃO DE MATÉRIAS-PRIMAS E MATERIAIS**

Nesta seção da pesquisa serão apresentados os métodos de caracterização das matérias-primas utilizadas na pesquisa.

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA**

No processo de caracterização das nanopartículas de sílica sintetizadas foram realizados diversos procedimentos que serão destacados nos próximos tópicos.

#### **4.1.1 Área de superfície específica**

Para a determinação da área de superfície e o tamanho e volume dos poros das amostras foi utilizado o ensaio de adsorção de N<sub>2</sub> a partir do método Brunauer–Emmett–Teller (BET) e BJH (*Barrett-Joyner-Halenda*) no equipamento Quantachrome modelo NOVA-1200e.

#### **4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho**

Com o objetivo de avaliar a formação de SiO<sub>2</sub> foi realizada a caracterização por espectroscopia no Infravermelho (FTIR), no espectrofotômetro de marca Bruker, modelo Tensor II, utilizando a técnica ATR, os materiais foram analisados numa resolução de 4 cm<sup>-1</sup> com um intervalo de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

#### **4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para avaliar a morfologia das nanopartículas foi utilizado a microscopia eletrônica de varredura utilizando um equipamento Zeiss EVO-MA10.

#### **4.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Tendo como objetivo avaliar o tamanho e a morfologia das nanopartículas foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), da marca JEM 1100.

#### **4.1.5 Análise DSC/TG**

Com o objetivo de identificar o comportamento térmico e percentual de carregamento foi utilizado a termogravimétrica (TGA) com acoplamento de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), utilizando o equipamento TA modelo Q600 na faixa de temperatura de 25-600 °C com taxa de aquecimento de 5 °C/min em atmosfera de nitrogênio.

### **4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCIMENTO E DOS COMPÓSITOS**

Os biocimentos foram caracterizados na forma de pó e após a hidratação.

#### **4.2.1 Caracterização do pó do biocimento e dos compósitos**

Os pós dos biocimentos e compósitos sintetizados foram caracterizadas por DRX, MET, FTIR, análise térmica DSC/TGA, para avaliar características físico-químicas, térmicas e estruturais.

##### **4.2.1.1 Difração de Raios X**

O pó do biocimento e dos compósitos foram caracterizadas por difração de raios X (DRX) em um equipamento Shimadzu, modelo XRD-6000 (radiação Cu K $\alpha$   $\lambda$ = 0,15405 nm) equipado com filtro de Ni e uma taxa de varredura de 2 ° por min. Essa caracterização foi realizada com o objetivo de avaliar a cristalinidade das partículas. Para a identificação das fases presentes no material foi utilizado o método Rietveld.

##### **4.2.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão**

A avaliação da morfologia e tamanho de partícula do pó de biocimento e dos compósitos foi realizada por meio de imagens do MET. O equipamento utilizado foi o mesmo relatado anteriormente.

#### 4.2.1.3 Espectroscopia de Infravermelho

Com o objetivo de avaliar os grupos funcionais característicos presentes nos pós do biocimento e dos compósitos foi realizada a caracterização por espectroscopia no Infravermelho (FTIR). Os materiais foram analisados por meio de um espectrômetro (BRUKER/TENSOR II, em uma faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.2.1.4 Análise DSC/TG

Para a identificação do comportamento do biocimento e dos compósitos foram utilizadas as mesmas especificações e o mesmo equipamento citado para a análise das nanopartículas de sílica.

### **4.2.2 Biocimento e compósitos hidratados**

Para os biocimentos e compósitos hidratados foram realizados os seguintes ensaios: calorimetria de condução isotérmica, tempo de cura, resistência mecânica à flexão e à compressão e fluido corporal simulado. Além destes testes foram realizados o DRX, MEV e FTIR nos intervalos de 7, 14 e 28 dias para avaliar a hidratação.

#### 4.2.2.1 Calorimetria de condução isotérmica

A Calorimetria isotérmica foi realizada para determinar o tempo de hidratação das pastas de cimento e a influência da sílica e do medicamento nesta propriedade. As amostras referência (cimento puro) e os demais cimentos com adição de sílica foram manipulados à mão por 2 min com razão água/sólidos de 0,7 mL/g, e inseridas em ampolas de vidro. Estas foram seladas e colocadas no equipamento (TAM Air Isothermal Calorimeter), logo após a mistura e monitoradas por 72 h. A energia liberada também foi medida e utilizada para calcular o grau de hidratação das amostras.

#### 4.2.2.2 Cura do biocimento e dos compósitos

O tempo de cura do biocimento e dos compósitos foi determinado em um aparelho de Vicat, com base na norma NBR 12128. Nesta análise, a mistura recém homogeneizada foi inserida em um recipiente com uma placa na base do aparelho de Vicat modificado, situado sob o tronco cônico. Em seguida foi anotado o tempo, contado a partir do instante em que o líquido e o pó entram em contato. O tronco cônico foi abaixado suavemente até a superfície da pasta no molde. Posteriormente, foi solto em intervalos de tempo crescentes. Quando sua ponta ativa não conseguia mais penetrar na pasta, foi anotado o tempo inicial de pega. A determinação do tempo de fim de pega foi identificada na face oposta do corpo de prova, que ficou originalmente em contato com a placa base.

Além do tempo de cura também foram realizados ensaios com os compósitos de biocimento em duas condições: na primeira, os compósitos foram colocados para o processo de cura em temperatura ambiente; no segundo, os compósitos foram colocados em uma estufa com temperatura controlada de 37,5 °C com umidade. Essas condições foram estabelecidas em razão da influência da umidade no processo de cura do material. Para este ensaio foram preparas 6 amostras para cada composição de biocimento sintetizada, totalizando 30 corpos de prova para cada método de cura.

#### 4.2.2.3 Porosidade

Para a realização do ensaio de porosidade foram preparados em triplicatas cada um dos cinco compósitos hidratados dos biocimentos sintetizados. Cada compósito de biocimento foi hidratado com fosfato dissódico. Desta forma foi obtida a pasta cimentícia, que em seguida foi transferida para formas no formato de comprimidos para obtenção de corpos de prova. Todos os corpos de prova foram pesados e medidos obtendo-se a altura e o diâmetro.

Posteriormente foram calculados o volume médio e a densidade aparente para cada compósito. As fórmulas para obtenção do volume e densidade aparente podem ser observadas abaixo:

$$\text{Volume médio} - V = \pi \cdot r^2 \cdot h$$

$$\text{Densidade média} - d_{ap} = \frac{m}{V}$$

Após o cálculo da densidade aparente, a densidade real foi calculada por meio da técnica de picnometria. Para tanto foi utilizado um picnômetro da marca Quantachrome, modelo Ultrapyc 1200e. O aparelho utiliza gás hélio para determinar o volume real do material e a densidade é calculada pela razão entre massa e volume. Com a densidade aparente e real calculadas foi possível obter a porosidade dos compósitos por meio da fórmula a seguir:

$$\text{porosidade} = 1 - \left( \frac{d_{ap}}{d_{real}} \right)$$

#### 4.2.2.4 Resistência mecânica à compressão diametral e módulo de elasticidade

Os ensaios de resistência mecânica à compressão diametral e módulo de elasticidade foram realizados na máquina universal de ensaios, 100kN, Modelo DL10000, com célula de carga foi de 5 kgf e velocidade de ensaio foi de 1 mm/min. Para o ensaio de resistência à compressão foram preparadas amostras de cada compósito com razão água/cimento de 0,7 mL/g.

Os compósitos foram misturados com um agitador mecânico de bancada (500 rpm/3 min) e inseridos em moldes cilíndricos (3 mm de altura x 8 mm de diâmetro), seladas e deixadas em ambiente com temperatura e umidade controladas ( $23 \pm 3$  °C e  $60 \pm 5\%$ ) até o momento da análise.

Os ensaios de resistência à compressão das amostras curadas por 7, 14 e 28 dias foram desmoldadas e retificadas sempre entre 2 e 3 h antes do ensaio. Para este ensaio foram preparas 6 corpos de prova para cada composição de biocimento, totalizando 30 corpos de prova.

#### 4.2.2.5 Ensaio de flexão

O ensaio mecânico de flexão teve como objetivo avaliar a resistência do material à tração na flexão. Esses ensaios foram realizados na máquina universal de ensaios, 100kN, Modelo DL10000, com célula de carga foi de 200 kgf e velocidade de

ensaio foi de 1 mm/min. Assim como no ensaio de compressão foram preparadas amostras de cada compósito com razão água/cimento de 0,7 mL/g.

Os compósitos foram misturados com um agitador mecânico de bancada (500 rpm/3 min) e inseridos em moldes cilíndricos no formato de bastões com 5 mm de altura, 7 mm de largura e 35 mm de comprimento. As amostras foram seladas e deixadas em ambiente com temperatura e umidade controladas ( $23 \pm 3$  °C e  $60 \pm 5\%$ ) até o momento da análise.

#### 4.2.2.6 Difração de Raios X

As especificações e equipamento para caracterização do biocimento seguem as mesmas utilizadas para as nanopartículas de sílica.

#### 4.2.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar a morfologia das nanopartículas foi utilizado a microscopia eletrônica de varredura.

### 4.3 TESTES *IN VITRO*

Com o objetivo de analisar o comportamento dos compósitos sintetizados foram realizados os seguintes estudos *in vitro*: Fluido Corporal Simulado, Viabilidade celular (ensaio MTT), hemocompatibilidade e ensaio de liberação do medicamento *in vitro*. Os testes *in vitro* foram realizados nos laboratórios de pesquisa do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS).

#### 4.3.1 Fluido corporal simulado

A bioatividade dos compósitos foi avaliada por exposição ao fluido corporal simulado (SBF), preparado de acordo com o método de Kokubo e Takadama (2006), no padrão ISO / FDIS 23317: 2007. Para a produção do SBF foram utilizados os seguintes íons:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ .

No experimento envolvendo fluido corporal simulado, foram utilizados 6 corpos de prova no formato de comprimidos de cada uma das 5 amostras, perfazendo

um total de 30 corpos de prova. Os corpos de prova foram imersos em 11 mL de SBF em frascos de polipropileno mantidos a 37 °C por 7, 14 e 28 dias. A solução SBF foi substituída a cada 7 dias. Após 7, 14 e 28 dias, dois corpos de prova de cada recipiente foram retirados da estufa e colocados para secar, para posteriormente serem pesados e encaminhados para o ensaio de FTIR. Após a exposição ao SBF os corpos de prova foram avaliados por:

- MEV – com objetivo de identificar a morfologia do biocimento hidratado;
- DRX – Para identificar as fases cristalinas presentes na amostra de biocimento, por meio de picos gerados na difração dos raios produzidos pelos átomos característicos do mineral, para identificar o material mais apropriado;
- FTIR – Para avaliar os grupos funcionais característicos presentes nos biocimentos hidratados.

#### 4.3.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular dos diferentes compostos foi avaliada em linhagem celular de fibroblasto (NIH3T3) murino. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Eagle Modificado (DMEM), suplementadas com 10% de soro fetal bovino, Penicilina (100 unidades/mL), Estreptomicina (100 mg/mL) e 4 mM/L de Glutamina a 37 °C, em garrafas de cultura celular de 25 mL e mantidas em uma estufa a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os reagentes foram obtidos pela Sigma Aldrich. Para propósitos experimentais, as células foram tripsinizadas e ajustadas para a concentração de 10<sup>4</sup> células/poço e plaqueadas em uma placa de cultura de fundo plano de 96 poços. Após o tempo de incubação (24 h), as células foram tratadas com meio DMEM contendo diferentes concentrações dos cimentos ósseos e/ou alendronato solubilizados em fosfato dissódico.

Para este estudo, foram utilizadas as seguintes concentrações: 10, 20 e 40 µg/mL dos compostos. As células tratadas com os diferentes compostos foram novamente incubadas por 24 h em estufa, a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o tempo de incubação (24 h), o sobrenadante celular foi retirado e 100 µL do Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il -2,5-difeniltetrazólio) (MTT) (Sigma, MO, EUA) foram adicionados para avaliar a viabilidade celular (KUMAR *et al.*, 2018).

#### 4.3.2.1 Teste de viabilidade celular – MTT

Para avaliar a viabilidade celular, o ensaio de MTT foi realizado. O teste MTT é um teste colorimétrico muito usado para avaliar a viabilidade celular. Esse tipo de ensaio se baseia na medida do dano induzido por composto em estudo no metabolismo celular, que ocorre usualmente por meio da avaliação da atividade de desidrogenase mitocondrial presente apenas em células metabolicamente viáveis. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular foram quantificadas pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração roxo e insolúvel em água). Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

Para isso, foi retirado o sobrenadante celular após o período de incubação dos tratamentos e 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionadas em cada poço. Na seqüência, a placa foi novamente incubada por três horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a reação de formação do formazan. Após o período de incubação, o meio contendo a solução de MTT foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de álcool isopropílico. A absorbância foi medida em 570 nm, utilizando-se um leitor de microplacas Infinite 200 TECAN. Os resultados foram apresentados como porcentagem de sobrevivência (100%).

#### 4.3.3 Hemocompatibilidade

Hemocompatibilidade é um importante parâmetro de qualidade dos glóbulos vermelhos compactados, que é usado para avaliar a integridade celular das unidades sanguíneas armazenadas (PRIYA *et al.*, 2020).

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, que os aprovou antes do início dos procedimentos experimentais, conforme autorização nº 3344689. Os eritrócitos humanos foram cedidos por três voluntários saudáveis. O sangue total, 3 mL, foi centrifugado por 10 min a 1.500 rpm para remover o sobrenadante, então foram feitas três lavagens com solução salina (0,9% NaCl) e centrifugado por três vezes para remover outras células e vestígios de plasma. Após

a terceira lavagem, o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram diluídos com 1,5 mL de solução salina (0,9% NaCl).

Após a obtenção dos eritrócitos, a atividade hemolítica foi avaliada por espectrofotometria. Os compostos selecionados para este ensaio foram incubados em diferentes concentrações (100, 200 e 400 µg/mL das amostras e 1, 2 e 4 µg/mL das composições de biocimento e medicamentos) e incubados com 50 µL de eritrócitos humanos ressuspensos em 950 µL de solução salina. O tempo de incubação foi de 1 h, com uma temperatura de 37 °C, sob agitação contínua de 100 rpm. Depois do período de incubação (1 h), a solução foi centrifugada por 5 min (10.000 rpm) à temperatura ambiente. Na sequência, 100 µL de sobrenadante da amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços. A porcentagem de hemocompatibilidade foi avaliada por espectrofotometria. Além disso, a absorbância foi medida em 540 nm, utilizando-se um leitor de microplacas Infanite 200 TECAN. O controle positivo (água destilada) e o controle negativo (solução salina) também foram realizadas. Os resultados foram expressos com a porcentagem da hemólise, obtidos a partir da equação abaixo:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{vn-cn}{cp-cn}$$

Onde vn= valor da absorbância; cn= controle negativo e cp= controle positivo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.3.4 Ensaio de liberação do medicamento**

A liberação foi realizada por meio de uma membrana de dialise (Spectra/Por® 6) de tamanho 1000Da. Foram pesadas as amostras (1 g) e colocadas no interior da membrana junto com o fosfato dissódico, pH 7,4 (5 mL). Então foram fechadas as extremidades da membrana e colocado em um béquer com 100 mL do meio receptor (solução de fosfato dissódico, pH 7,4). O meio receptor foi mantido a 37 °C em banho-maria. Em 0, 15, 30, 60, 75, 90, 105 min, uma alíquota foi retirada da solução presente no meio interno na membrana para a leitura por espectrofotometria UV (262 nm).

Um gráfico Absorbância vs tempo de incubação foi realizado utilizando o software GraphPad Prism 8. A partir do gráfico foi medido o tempo correspondente a 50% do fármaco liberado.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados de todo o desenvolvimento desta pesquisa. Todo o processo de síntese e caracterização das nanopartículas de sílica, a rota de síntese e caracterização da hidroxiapatita. Posteriormente são demonstrados o processo de tratamento térmico da hidroxiapatita para obtenção do biocimento, a incorporação das nanopartículas de sílica ao biocimento, bem como o processo de hidratação do biomaterial e sua utilização na entrega de medicamentos *in vitro*. Todos os materiais foram caracterizados e seus resultados foram analisados com a literatura atual.

### 5.1 NANOPÁRTÍCULAS DE SÍLICA

A nanopartículas de sílica obtidas pela rota 1 e 2 foram sintetizadas por meio do método de Stöber. Este método envolve a síntese de nanopartículas esféricas de dióxido de silício a partir da hidrólise e condensação do TEOS em etanol e água, utilizando amônia como catalisador, é possível obter partículas esféricas com tamanho uniforme, sendo possível obter partículas entre 5 e 2000 nm. Além disso esse método é versátil e rápido (FERNANDES, 2014). No tópico a seguir é possível identificar a formação de partículas nessa faixa de valores.

No caso específico das nanopartículas de sílica da rota 2, elas foram sintetizadas por meio de uma adaptação do método de Stöber descritas no trabalho de Doadrio *et al.* (2017). O processo para obtenção das duas nanosilicas é muito similar exceto pelo surfactante adicional utilizado na rota 2. As moléculas do CTAB formam micelas, superfície onde a policondensação de sílica ocorre durante a hidrólise do TEOS. O tipo de surfactante alterou o tamanho o formato dos mesoporos e determinou uma maior área superficial.

As nanopartículas de sílica sintetizadas foram caracterizadas por BET, DSC/TG, FTIR, MEV e MET.

#### 5.1.1 Área superficial (BET)

Como pode ser observado na Tabela 2, as nanopartículas de sílica obtidas pela Rota 1 apresentaram uma área superficial de 177,1 m<sup>2</sup>/g, com um volume de 0,45

cm<sup>3</sup>/g e um raio de 53,75 Å. Por outro lado, as nanopartículas de sílica da Rota 2 apresentaram uma área superficial significativamente maior, de 654,6 m<sup>2</sup>/g, com um volume de 1,22 cm<sup>3</sup>/g e um raio de 52,87 Å.

Tabela 2 – Área superficial (ABET), volume (VPBJH) e raio (RPBJH) das nanopartículas de sílica.

<b>Amostra</b>	<b>ABET (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>VPBJH (cm<sup>3</sup>/g)</b>	<b>RPBJH (Å)</b>
<b>Nanopartículas de sílica rota 1</b>	177,085	0,450	53,750
<b>Nanopartículas de sílica rota 2</b>	654,600	1,220	52,870

Fonte: Do autor, 2023.

Os resultados ressaltam que a Rota 2 foi capaz de gerar um material com uma área de superfície significativamente maior (3,7 vezes maior, como indicado por ABET). Além disso, vale destacar que o volume de poros (VPBJH) também foi maior (2,7 vezes maior), embora o raio do poro tenha apresentado similaridade entre ambas as rotas. Bitar *et al.* (2012) e Ding *et al.* (2017) relataram que nanopartículas de sílica nessa faixa de valores podem favorecer a entrega de medicamentos. Vale ressaltar que a formação de nanopartículas de sílica mesoporosas ocorre de forma semelhante ao método Stöber, com a única diferença sendo o uso de um surfactante adicional que contribui para a formação de mesoporos.

No entanto, o raio do poro das duas nanopartículas de sílica acabou sendo bastante similar. A distinção entre elas reside na área de superfície e no volume. As moléculas de CTAB, usadas na produção das nanopartículas de sílica mesoporosas, formam micelas, superfícies onde ocorre a policondensação da sílica durante a hidrólise do TEOS, resultando na nanoestrutura mesoporosa da nanopartícula de sílica. Além disso, o CTAB, além de contribuir para a formação do tamanho do poro, pode influenciar diretamente a área de superfície e o volume, fornecendo uma área de superfície e um volume de poro maiores, o que ficou evidente nas nanopartículas de sílica obtidas pela rota 2.

Os resultados obtidos indicam claramente que o tipo de surfactante altera a morfologia dos mesoporos (CAO *et al.*, 2012; ZANONI *et al.*, 2019). Também vale ressaltar que a área de superfície obtida está dentro da faixa esperada para o método

Stöber para ambas as nanopartículas de sílica sintetizadas. As áreas de superfície obtidas pelo método Stöber podem variar de 10 a 346 m<sup>2</sup>/g (CAO *et al.*, 2012). Quanto às áreas de superfície obtidas pelo método Stöber para sílicas mesoporosas, elas podem variar de 289 a 1157 m<sup>2</sup>/g (CAO; KRUK, 2013).

O Quadro 9, apresenta a área superficial obtida pelo método Stöber para as duas rotas de sínteses desenvolvida por diversos autores.

Quadro 9 – Área superficial das partículas de sílica obtidas por diversos autores.

<b>Nanopartículas de sílica sintetizadas</b>	<b>Autor</b>	<b>ABET (m<sup>2</sup>/g)</b>
rota 1	Do autor, 2023	177,085
	Fernandes (2014)	166,000
	Zuo <i>et al.</i> (2021)	64,300
	Bourebrab <i>et al.</i> (2018)	230,000
rota 2	Do autor, 2023	654,600
	Fonseca <i>et al.</i> (2018)	658,300
	Doadrio <i>et al.</i> (2017)	1047,600
	Cao e Kruk (2013)	850,00

Fonte: Do autor, 2023.

Observa-se que podem ser obtidas nanopartículas de sílica com áreas superficiais de diferentes tamanhos. Conforme o Quadro 9, fica evidente que a sílica da rota 1 obtida neste trabalho apresentou uma área superficial de 113 m<sup>2</sup>/g aproximadamente a mais que a sintetizada por Zuo *et al.* (2021). Em contrapartida apresentou uma área superficial de 53 m<sup>2</sup>/g aproximadamente a menos que a proposta por Bourebrab *et al.* (2018). Com relação a nanopartículas de sílica obtida pela rota 2, esta apresentou praticamente a mesma área superficial sintetizada por Fonseca *et al.* (2018) entretanto 200 m<sup>2</sup>/g inferior a proposta por Cao e Kruk (2013).

As dimensões nanométricas das nanopartículas de sílica, combinadas com sua alta relação área superficial/volume e superfície porosa, as tornam especialmente adequadas como veículos para a liberação controlada de medicamentos. (CABRAL, 2015).

A síntese de nanopartículas de sílica permite a obtenção de materiais com uma alta área de superfície com acessibilidade de superfície interna aprimorada, tamanhos de poros ajustáveis e volumes de poros. (MAITY; POLSHETTIWAR, 2017)

As dimensões nanométricas das NPs de sílica, a sua elevada razão área superficial e volume de poros na sua superfície, faz com que esta destaque-se na utilização como veículos para a libertação controlada de fármacos. (CABRAL, 2015)

O tamanho das nanopartículas de sílica é fundamental na determinação da área, quanto menor o tamanho da partícula maior a área superficial. (CHAPA-GONZÁLEZ; PIÑÓN-URBINA; GARCÍA-CASILLAS, 2018; FERNANDES, 2014)

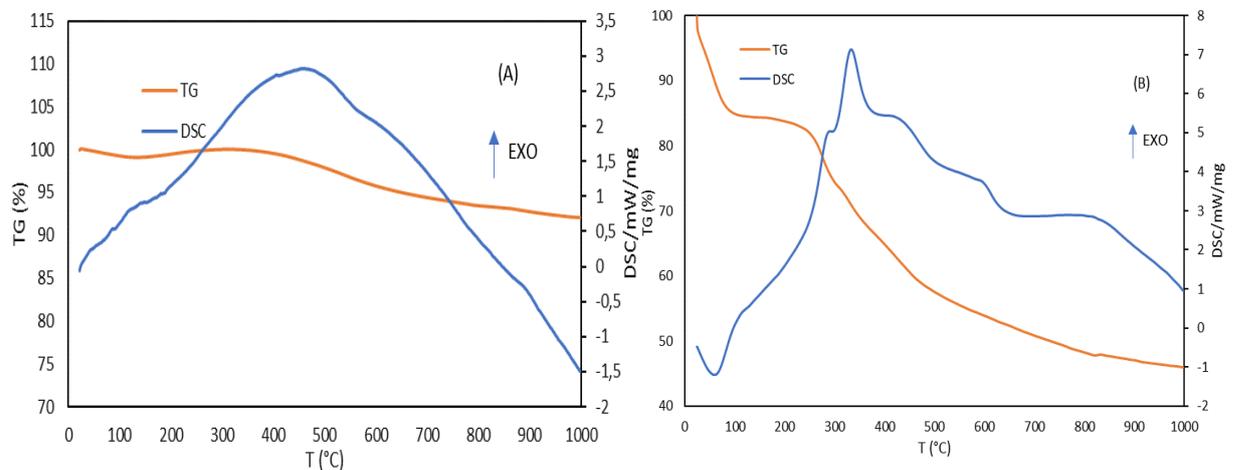
### 5.1.2 Análise TGA

A análise TGA é uma técnica analítica utilizada para determinar a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo. No caso específico da sílica, pode ser útil para determinar sua estabilidade térmica e suas propriedades de decomposição.

Por meio desse ensaio, é possível obter informações sobre a temperatura na qual a amostra começa a perder massa, bem como a taxa de perda de massa à medida que a temperatura é aumentada. Além disso, é possível identificar as diferentes fases de decomposição da amostra e a temperatura na qual elas ocorrem.

A análise do comportamento térmico das nanopartículas de sílica obtidas pela rota 1(A) e rota 2(B) são ilustradas na Figura 15.

Figura 15 – Análise termogravimétrica e DSC das nanopartículas de sílica: (A) rota 1 e (B) rota 2.



Fonte: Do autor, 2023.

A análise termogravimétrica da Figura 15(A), que apresenta a rota 1 das nanopartículas de sílica, mostrou um percentual de perda em massa de aproximadamente 5%; esse fato se deve em razão do material não apresentar muito material orgânico e grande parte desta perda está relacionada com a liberação da água da estrutura da sílica (CHAPA-GONZÁLEZ; PIÑÓN-URBINA; GARCÍA-CASILLAS, 2018; LOPES, 2017) .

Observa-se também a 450 °C a transformação de quartzo, que é comum para as sílicas (GOMES; FURTADO; SOUZA, 2018)

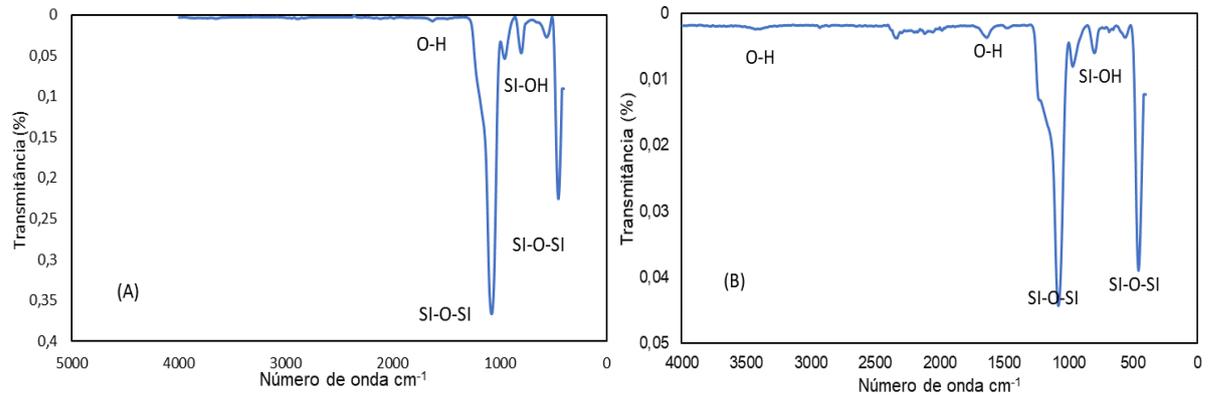
A Figura 15(B) apresenta análise termogravimétrica para as nanopartículas de sílica da rota 2, que atingiu uma perda total de aproximadamente 50% de massa. Pode-se observar que 15% desta perda ocorre até a temperatura de 100 °C. Esta perda está relacionada a saída de água fisicamente adsorvida (EZZEDDINE *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2016). Posteriormente, observa-se um evento típico de decomposição do molde orgânico entre 200 e 400 °C, correspondendo a mais 20% de perda de massa (FONSECA *et al.*, 2018; JUHÁSZ *et al.*, 2012) . Finalmente, na faixa de 400 a 900 °C, ocorre mais uma perda de massa no valor de 15% que corresponde à condensação de grupos silanóis restantes (EZZEDDINE *et al.*, 2015). Pode-se observar ainda a formação do quartzo a 350 °C na curva de DSC.

Importante destacar ainda, com base nestes resultados que os compostos orgânicos da síntese como o surfactante CTAB utilizado, ainda aparecem presentes na sílica e foram removidos no processo de queima.

### **5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)**

Com o intuito de confirmar a formação de sílica foi utilizado o ensaio de espectroscopia de infravermelho. Na Figura 16 pode-se observar esse resultado.

Figura 16 – Espectroscopia de Infravermelho das nanopartículas: (A) rota 1 e (B) rota 2.



Fonte: Do autor, 2023.

Na Figura 16(A) observa-se a formação da matriz de sílica, pela presença da banda de estiramento do grupo  $\text{-OH}$  em  $1640\text{ cm}^{-1}$  que também é associada ao grupo silanol ( $\text{Si-OH}$ ) observado em  $650\text{ cm}^{-1}$ . Os picos de banda associam-se a vibração de do estiramento assimétrico de  $\text{Si-O-Si}$  evidenciados em  $1000\text{ cm}^{-1}$  e  $450\text{ cm}^{-1}$  (NI *et al.*, 2019).

Zulfiqar, Subhani e Husain, (2016) e Wang *et al.* (2010) sintetizaram sílicas sólidas e encontraram as mesmas bandas de estiramento dos grupos  $\text{-OH}$ ,  $\text{Si-OH}$  e  $\text{Si-O-Si}$  com os mesmos picos de banda, corroborando com os resultados encontrados na síntese de sílicas da rota 1.

Na Figura 16(B) representa o FTIR das nanopartículas de sílica da rota 2, observa-se um comportamento muito semelhantes as nanopartículas de sílica da rota 1, abordada na Figura 16(A). Como destacado, apresenta uma formação da matriz de sílica, com banda de estiramento do grupo  $\text{-OH}$ , que também é associada ao grupo silanol ( $\text{Si-OH}$ ). Como evidenciado também na sílica sólida, os picos ocorrem nas bandas de  $1100\text{ cm}^{-1}$  e  $450\text{ cm}^{-1}$ , associando-se ao estiramento assimétrico de  $\text{Si-O-Si}$  (ZANONI *et al.*, 2019)

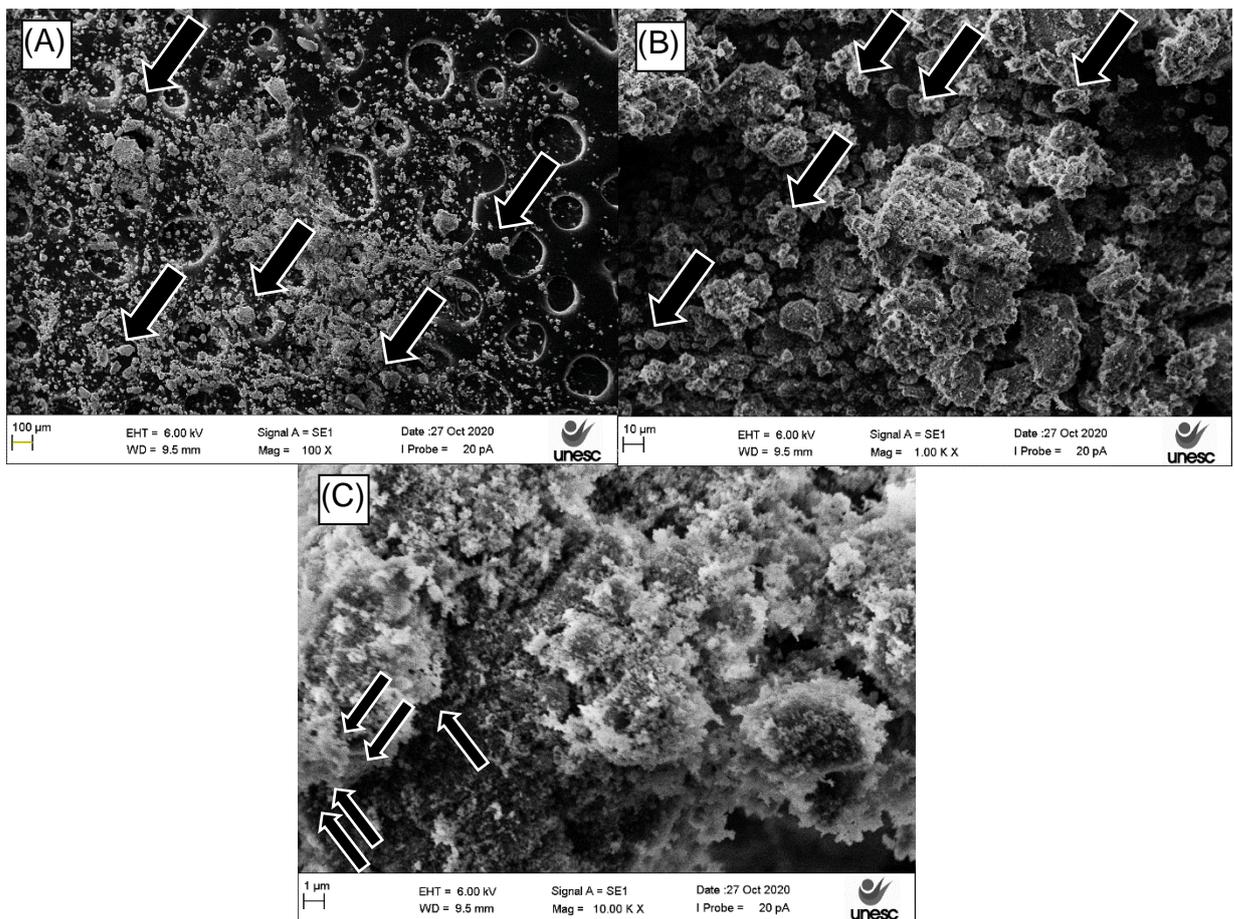
Existe ainda a presença de uma banda a  $1600\text{ cm}^{-1}$ ; esse fator corresponde a água adsorvida no modo deformação angular (LOPES, 2017).

Conforme Doadrio *et al.* (2017), Fernandes *et al.* (2016) e Lopes, (2017) os grupos funcionais encontrados nas faixas de bandas correspondentes desta pesquisa correspondem ao esperado para nanopartículas de sílica obtidas com a utilização do surfactante CTAB.

### 5.1.4 Análise morfológica das nanopartículas de sílica obtidas pela rota 1 por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com o propósito de evidenciar a morfologia das nanopartículas de sílica da rota 1, a Figura 17 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a amostra de nanopartículas de sílica sintetizada. Na imagem é possível identificar a formação de nanopartículas de sílica. Foram utilizadas ampliações de 100, 1000 e 10000 vezes para 100, 10 e 1  $\mu\text{m}$  conforme pode-se observar na Figura 17.

Figura 17 – Imagem de nanopartículas de sílica obtida por MEV (A) 100  $\mu\text{m}$  (B) 10  $\mu\text{m}$  (C) 1  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Do autor, 2023.

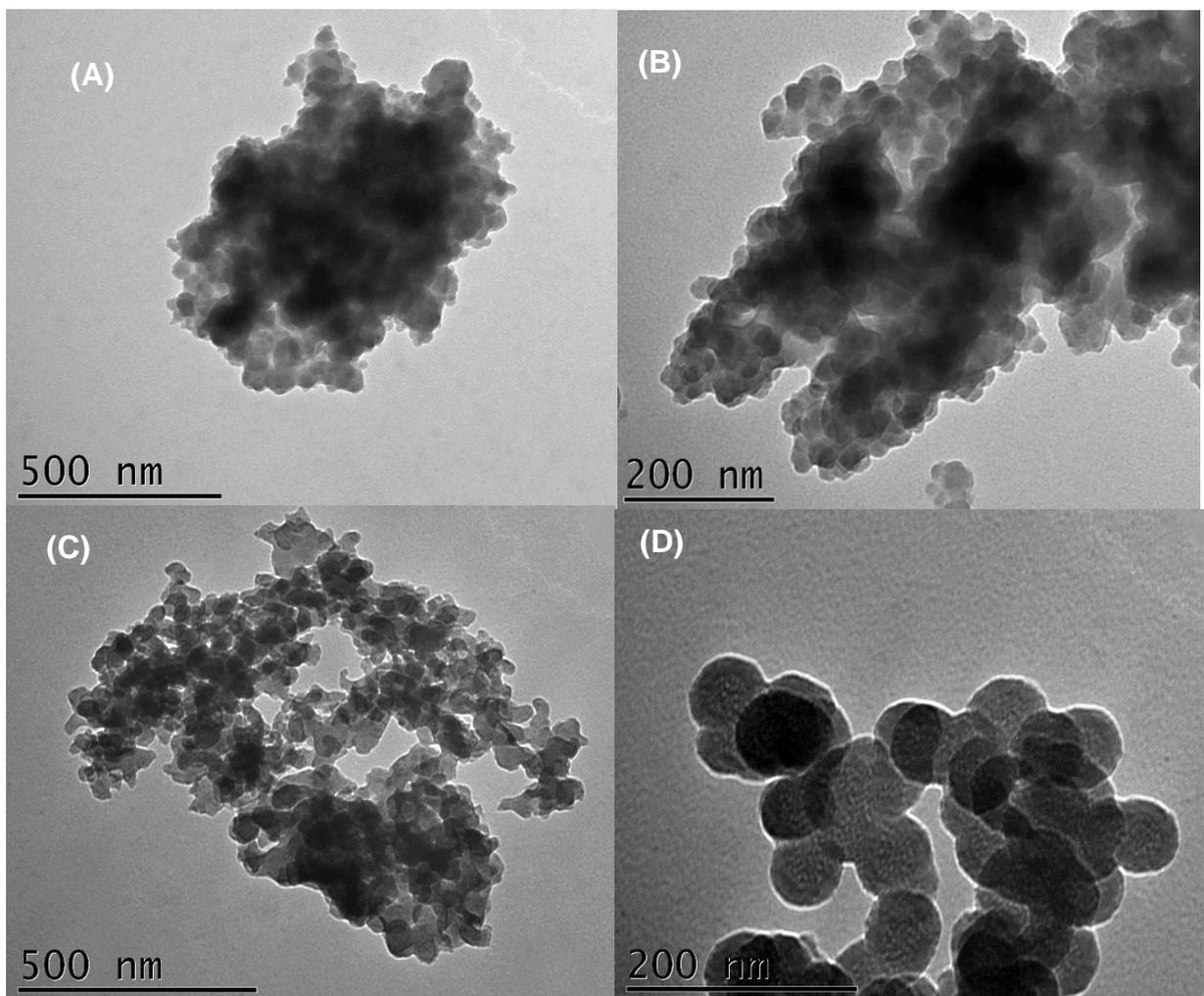
Conforme pode-se observar na Figura 17, as nanoestruturas sintetizadas apresentaram-se com tamanho inferior a 100  $\mu\text{m}$ , desta forma corroborando com a natureza de materiais nanométricos. Salienta-se ainda que esta nanopartícula de

sílica apresentou uma morfologia esférica e sólida. As características observadas nas nanopartículas de sílica sintetizadas apresentam resultados de acordo com a literatura (IBRAHIM, ZIKRY e SHARAF, 2010; GOMES; FURTADO; SOUZA, 2018; ESCOTO-VIVERO, 2012).

### 5.1.5 Análise morfológica das nanopartículas de sílica obtidas pela rota 1 e 2 por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para destacar a morfologia das nanopartículas de sílica, a Figura 18 apresenta imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das amostras de nanopartículas de sílica sintetizadas.

Figura 18 – Imagem de nanopartículas de sílica obtida por MET para as nanopartículas de sílica para a rota 1(A) e (B) e rota 2 (C) e (D).



Fonte: Do autor, 2023.

As Figuras 18(A) e 18(B) apresentam imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de sílica obtidas na rota 1. As imagens confirmam sua morfologia esférica e sólida, conforme descrito neste estudo. Vale ressaltar que as imagens das nanopartículas de sílica mostraram-se aglomeradas. Essa aglomeração está relacionada ao processo de secagem do material, como relatado nos trabalhos de Bitar *et al.* (2012), e Ibrahim, Zikry e Sharaf (2010).

As Figuras 18(C) e 18(D) ilustram imagens de TEM das nanopartículas de sílica obtidas por meio da rota 2, confirmando a natureza nanométrica do material. Nestas imagens, a natureza mesoporosa do material pode ser observada e confirmada, com pequenas cavidades presentes em toda a matriz de sílica. Essas características são atribuídas ao método de síntese que emprega o CTAB como surfactante. Além disso, as nanopartículas obtidas pela rota 2 exibem uma boa dispersão (JAMBHRUNKAR *et al.*, 2014; ZANONI *et al.*, 2019).

## 5.2 FOSFATO DE CÁLCIO

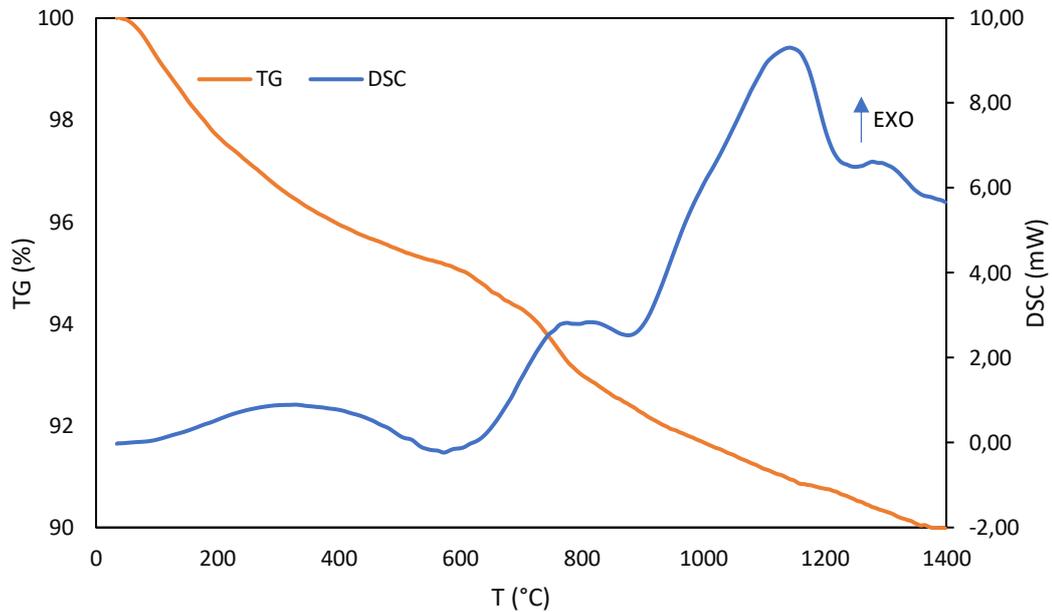
Neste tópico serão apresentados os resultados referentes a síntese do fosfato de cálcio sintetizado neste trabalho.

### 5.2.1 Análise TGA

O ensaio de termogravimetria, tem como objetivo, obter informações sobre a temperatura na qual a amostra começa a perder massa, bem como a taxa de perda de massa à medida que a temperatura é aumentada. Além disso, é possível identificar as diferentes fases de decomposição da amostra e a temperatura na qual elas ocorrem.

A análise do comportamento térmico do fosfato de cálcio sintetizado é ilustrada abaixo por meio da Figura 19.

Figura 19 – Análise termogravimétrica e DSC do fosfato de cálcio.



Fonte: Do autor, 2023.

Na Figura 19 pode-se observar o comportamento térmico dos pós nanoestruturados de fosfato de cálcio obtidos por meio da síntese desenvolvida. Fica evidenciado na Figura 19 picos que indicam a transformação do fosfato de cálcio, que na curva de análise térmica diferencial ocorre próximo de 800 e 1180 °C. Destaca-se ainda uma perda de massa gradativa de 10% até 1400 °C.

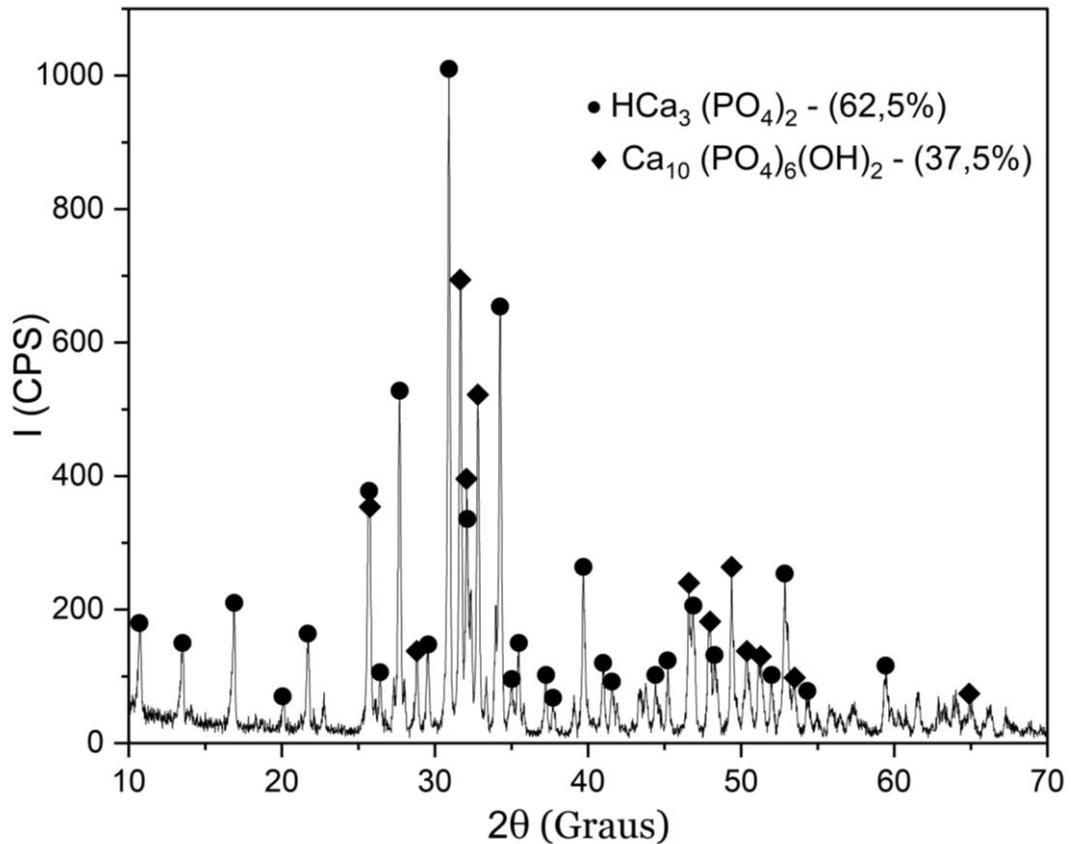
Convém destacar ainda que por meio da análise do comportamento térmico é possível identificar três momentos de perda de massa. No primeiro momento próximo dos 100 °C, ocorre uma perda de massa de 2% com relação ao total. A segunda ocorreu em aproximadamente a 250 °C, onde observa-se novamente 2% de perda de massa com relação ao total, estas perdas estão associadas a perda de água do material e à decomposição residual da matéria orgânica. Manjubala e Sivakumar (2001) em seus trabalhos evidenciaram este comportamento. A última perda de massa ocorreu próximo a 600 °C estendendo-se a 1400 °C, correspondendo a mais 6% de perda de massa com relação ao todo, e está relacionada à descarbonização. Esta última evidência também foi encontrada nas pesquisas de Sofronia *et al.* (2014).

Pode-se observar pela curva de DSC da figura 19, em aproximadamente 805 °C um pico exotérmico, indicativo da transformação de fase dos fosfatos de cálcio; outro pico exotérmico ocorre a 1150 °C, característico da transformação da HPA em TCP *alpha* (SILVA *et al.*, 2017).

### 5.2.2 Difração de Raios X

A difração de raios X é utilizada para determinar a estrutura cristalina do material, além de identificar as fases presentes, o que permite compreender suas propriedades físicas e biológicas. Na Figura 20 observa-se os picos apresentados pelo fosfato de cálcio sintetizado.

Figura 20 – Difração de Raios X do fosfato de cálcio.



Fonte: Do autor, 2023.

A Tabela 3 apresenta a relação proporcional das fases encontradas.

Tabela 3 – Fases do fosfato de cálcio sintetizado

ICSD	Fase	Percentual
26204	Hidroxiapatita	37,5%
6191	Fosfato de Cálcio hidratado Whitlockite	62,5%

Fonte: Do autor, 2023.

Por meio dos resultados apresentados na Figura 20, observa-se um material bifásico com picos representativos de fosfato de cálcio whitlockite e hidroxiapatita. O resultado do difratograma de raios X aponta para a presença de picos representativos da fase hidroxiapatita estequiométrica, na composição  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , com estrutura cristalina hexagonal e plano principal de difração. As fases apresentadas estão de acordo com os trabalhos de Kim, An e Cho (2018) e Landi *et al.* (2008). A fase de hidroxiapatita foi identificada pela carta ICSD 26204, enquanto a fase do fosfato de cálcio hidratado Whitlockite pela carta ICSD 6191.

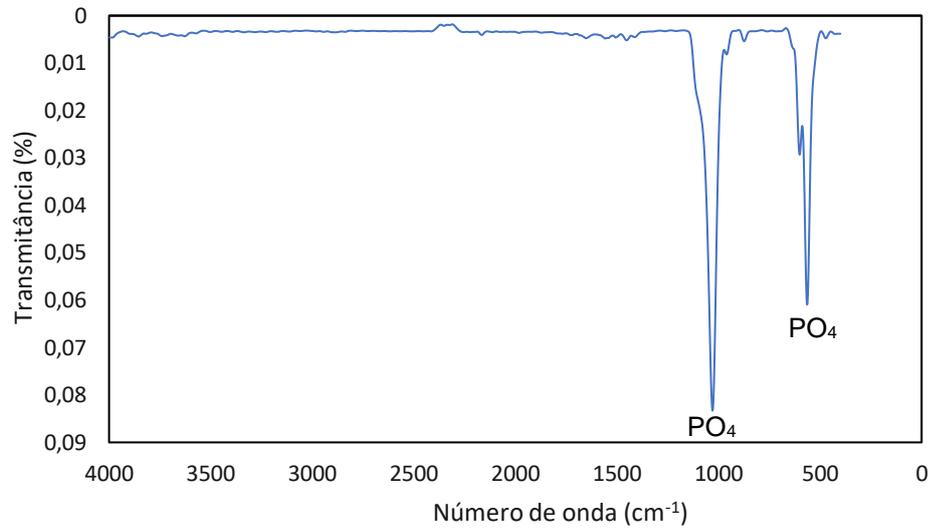
Cabe destacar ainda, que o difratograma, aponta para presença de picos de baixa intensidade da fase Fosfato de Cálcio hidratado Whitlockite. A Tabela 3 destaca que a composição do material é de 62,5 % de Fosfato de Cálcio hidratado Whitlockite e 37,5 % de hidroxiapatita.

### 5.2.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica analítica comum utilizada para identificar e caracterizar compostos químicos em materiais biológicos e sintéticos. Especificamente no caso da hidroxiapatita, o ensaio de FTIR é frequentemente utilizado para investigar as propriedades químicas da sua estrutura e superfície.

Essa técnica é utilizada para identificar e quantificar esses grupos funcionais, fornecendo informações sobre a composição química do material. A Figura 21 apresenta a espectroscopia de infravermelho do fosfato de cálcio sintetizado visando evidenciar a caracterização deste material

Figura 21 – Espectroscopia de Infravermelho do fosfato de cálcio sintetizado.



Fonte: Do autor, 2023.

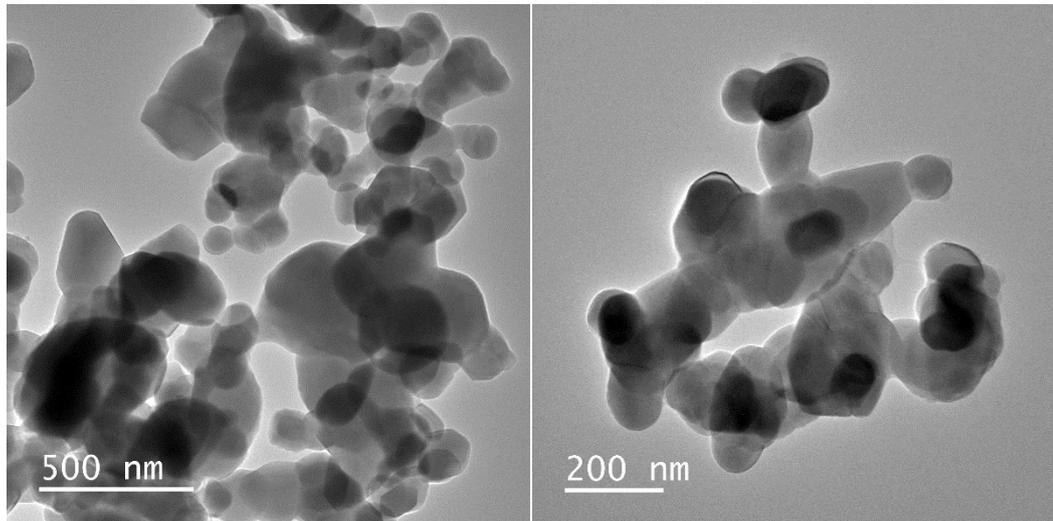
A Figura 21 apresenta o espectrograma da hidroxiapatita. Os picos de banda associam-se à vibração de  $\text{PO}_4$  evidenciados em  $560\text{ cm}^{-1}$ ,  $603\text{ cm}^{-1}$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$ . Estas características já foram observadas por diversos autores em trabalhos que envolvem a síntese de fosfato de cálcio e hidroxiapatita. Dalmônico (2015), Franczak *et al.* (2017) e Silva (2017), encontraram resultados semelhantes na caracterização por esse método.

Além disso os modos vibracionais de  $\text{PO}_4$  que foram identificados na Figura 21 corroboram com os dados observados por Drouet (2013), Eilbagi *et al.* (2016) e He *et al.* (2021).

#### 5.2.4 Análise morfológica do pó de fosfato de cálcio por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Com o objetivo de identificar as características morfológicas do pó de fosfato de cálcio, foram obtidas imagens por meio de MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão). A Figura 22 apresenta as imagens obtidas das nanopartículas de fosfato de cálcio.

Figura 22 – Imagem de nanopartículas do fosfato de cálcio obtida por MET.



Fonte: Do autor, 2023.

A Figura 22 mostra que antes do processo de tratamento térmico do fosfato de cálcio, pode-se observar que a estrutura é compatível com outras estruturas de fosfato de cálcio obtidas (CAMARGO; SOARES; GEMELLI, 2007; DIEZ-ESCUADERO; ESPANOL; GINEBRA, 2020).

A presença de cristais de fosfato de cálcio, como observado na Figura 22, é desejável pois eles são bioativos, ou seja, têm a capacidade de interagir com os tecidos biológicos circundantes e promover a formação e crescimento de novo tecido ósseo.

A morfologia apresentada na Figura 22 é consistente com estudos realizados por Silva *et al.* (2017), que mostraram uma morfologia similar na síntese do biocimento.

### 5.3 BIOCIMENTO

Por meio do tratamento térmico aplicado ao fosfato de cálcio, o biocimento foi obtido. O tratamento térmico foi realizado num forno mufla de alta temperatura da marca Fortelab série 1600, durante um período de 2 h a temperatura de 1300 °C. A rota escolhida para a transformação do fosfato de cálcio em biocimento foi adaptada da proposta de Franczak *et al.* (2017).

O tratamento térmico para obtenção de biocimento de fosfato de cálcio é capaz de influenciar as propriedades físicas, químicas e biológicas do material produzido. De modo geral, o tratamento térmico é utilizado para remover os compostos inorgânicos presentes no fosfato, tais como a água e grupos hidroxila, que podem afetar negativamente a estabilidade e a resistência do material. Além disso, pode ajudar a densificar a estrutura do material, melhorando suas propriedades mecânicas, tais como a resistência à compressão e dureza. Por meio do tratamento térmico, pode-se obter um material com uma superfície mais porosa e rugosa, que pode melhorar a aderência e proliferação de células ósseas, promovendo a formação de osso novo (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; LIAO *et al.*, 2004; LINK *et al.*, 2006).

A seguir são demonstradas todas as etapas de caracterização do biocimento obtido.

### 5.3.1 Análise química

Para identificação da composição, foi realizada a análise química do biocimento, conforme pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise química do biocimento sintetizado.

Elemento	Teor [%]
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,125
CaO	53,09
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-
K <sub>2</sub> O	-
MgO	-
MnO	-
Na <sub>2</sub> O	-
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	46,7
SiO <sub>2</sub>	0,130
TiO <sub>2</sub>	<0,05
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-
SrO	-
ZnO	-
Perda ao fogo	<0,39

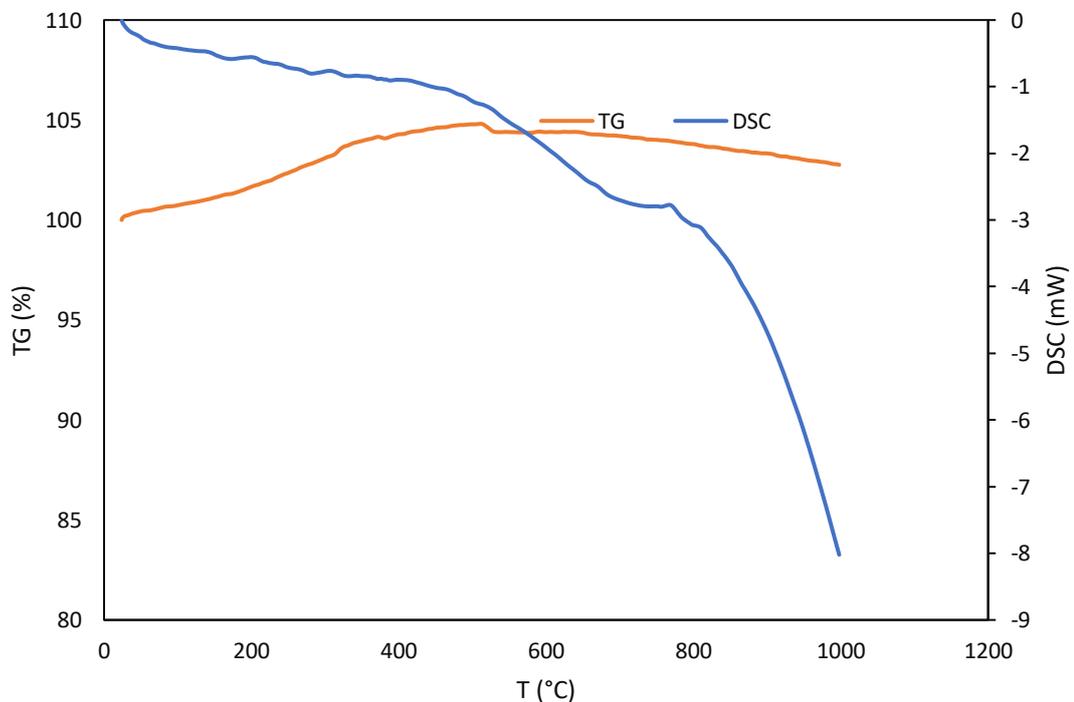
Fonte: Do autor, 2023.

Os resultados da análise química evidenciam que o biocimento é constituído principalmente por óxido de cálcio com cerca de 53,09% e pentóxido de difósforo com cerca de 46,7%. Estes elementos são característicos da composição de biocimentos de fosfato de cálcio. Convém destacar ainda a pequena presença de óxido de alumínio com cerca de 0,125% e óxido de silício com 0,130%. A análise apresentou ainda uma perda ao fogo menor que 0,39%.

### 5.3.2 Análise TGA

Como mencionado anteriormente, o ensaio de termogravimetria para o pó de fosfato de cálcio apresentou um percentual de perda de massa de 10%. Após o tratamento térmico e, conseqüentemente, com a obtenção do pó de biocimento, este também foi encaminhado para o ensaio de termogravimetria. Por meio da Figura 23, é apresentada a termogravimetria após o tratamento térmico do fosfato de cálcio.

Figura 23 – Termogravimetria das nanopartículas de biocimento.



Fonte: Do autor, 2023.

A análise termogravimétrica da Figura 23 apresenta um pequeno ganho de massa para a amostra de biocimento. Durante o tratamento térmico, a água foi

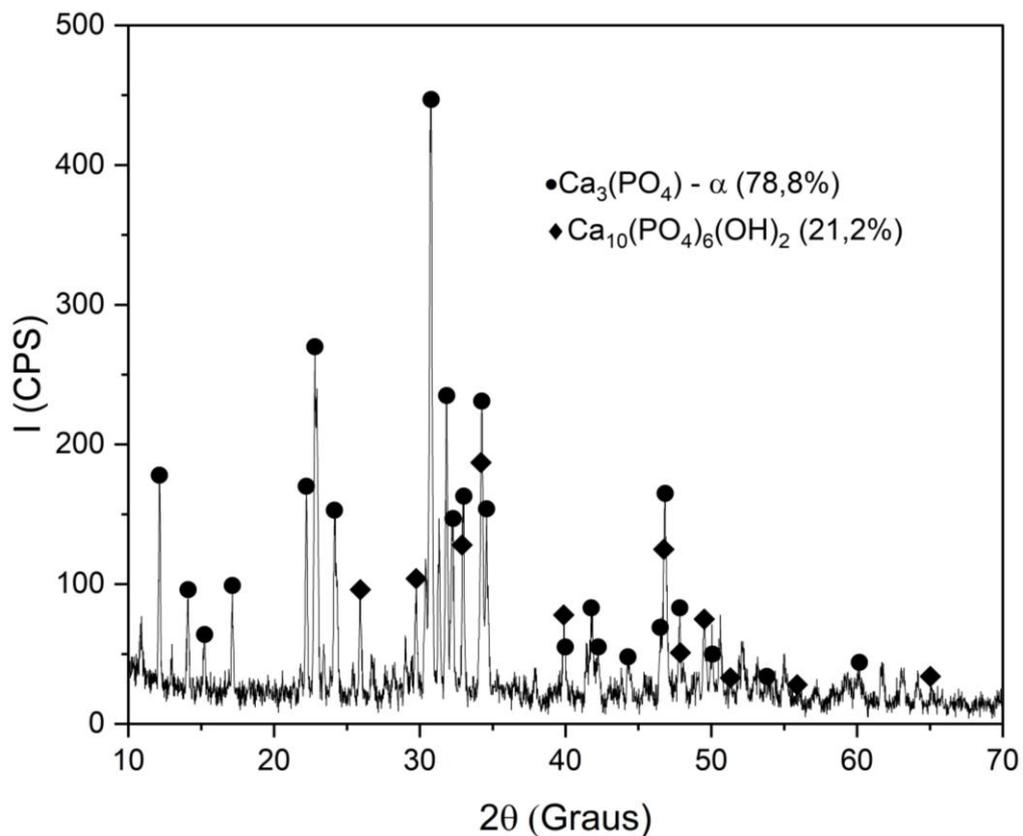
removida da estrutura, o que levou a um aumento na densidade e na compactação das camadas de íons de cálcio e fosfato. Além deste fator o tratamento térmico pode ocasionar defeitos na estrutura cristalina da hidroxiapatita o que pode ocasionar neste pequeno ganho de massa (BERZINA-CIMDINA *et al.*, 2012; DING *et al.*, 2015; DOBROVOL'SKAYA *et al.*, 2018; DOROZHKIN, 2013).

Por meio da curva de DSC da Figura 23 pode-se observar a 800 °C a reorganização dos cristais de TCP e HPA (SILVA, *et al.* 2017).

### 5.3.3 Difração de Raios X

Para identificar as fases cristalinas presentes na amostra do pó de biocimento, foi realizado o difratograma de raios X. A Figura 24 apresenta os picos presentes do material obtido.

Figura 24 – Difratograma de Raio X do biocimento obtido.



Fonte: Do autor, 2023.

A Tabela 5 apresenta a relação proporcional das fases encontradas após o tratamento térmico para a formação do biocimento.

Tabela 5 – Fases presentes no pó de biocimento sintetizada

ICSD	Fase	Percentual
26204	Hidroxiapatita	21,2
923	Fosfato de Cálcio <i>alpha</i>	78,8

Fonte: Do autor, 2023

As composições das fases do biocimento identificadas pelo DRX, apontaram para um material constituído de duas fases: fosfato de cálcio *alpha* ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) e hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). A fase de hidroxiapatita foi identificada pela carta ICSD 26204, enquanto a fase do fosfato de cálcio pela carta ICSD 923. O biocimento apresentou um percentual de 21,2% de hidroxiapatita e 78,8% de fosfato de cálcio *alpha*. Estes resultados já foram evidenciados por Lourenço (2016).

Como pode-se observar, ocorreu a formação de hidroxiapatita; o processo pelo qual o biocimento forma a fase de hidroxiapatita envolve uma reação química conhecida como cimentação. A combinação de cálcio e fosfato é essencial para a formação de hidroxiapatita. A presença de íons cálcio e fosfato em quantidade adequada possibilitou a reação química espontânea na qual os íons se combinaram para formação de cristais de hidroxiapatita.

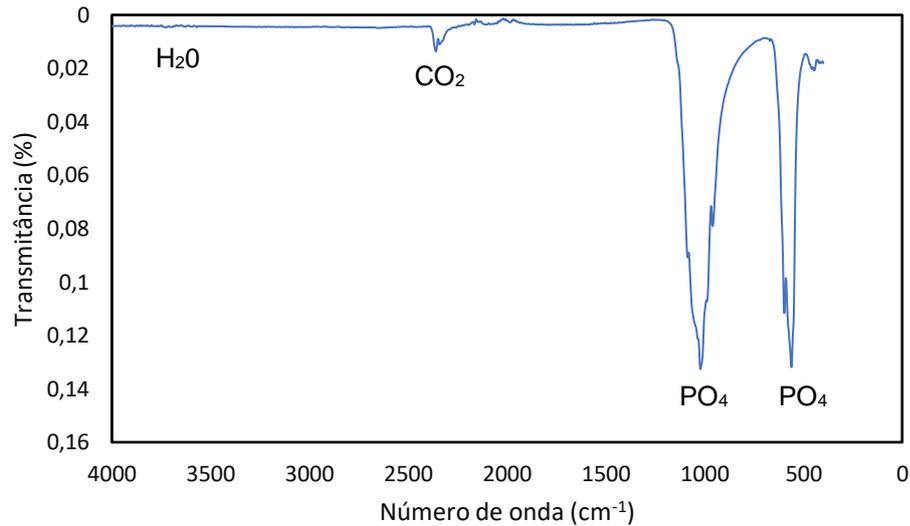
Silva *et al.* (2018), sintetizaram biocimentos de fosfato de cálcio e identificaram as duas fases evidenciadas neste estudo. Em relação à evidência da presença da fase *alpha* do fosfato de cálcio, os picos mais intensos podem ser encontrados em ângulos de difração de aproximadamente 31,7°, 32,9° e 33,9° (HENCH, 1991; RAJABI *et al.*, 2007) .

Cabe destacar ainda que durante o tratamento térmico na hidroxiapatita, ocorrem a formação de defeitos cristalinos em sua estrutura da hidroxiapatita. Esses defeitos podem ser lacunas de íons, deslocamentos de átomos ou outras distorções na estrutura cristalina. Desta forma, esses contribuem para o aumento da massa da hidroxiapatita, pois eles ocupam espaço adicional na estrutura cristalina (BERZINA-CIMDINA *et al.*, 2012; DOBROVOL'SKAYA *et al.*, 2018).

### 5.3.4 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Por meio da Figura 25 é apresentado os grupos funcionais característicos presentes nos biocimentos por meio da espectroscopia de infravermelho.

Figura 25 – Espectroscopia de infravermelho do biocimento obtido.



Fonte: Do autor, 2023.

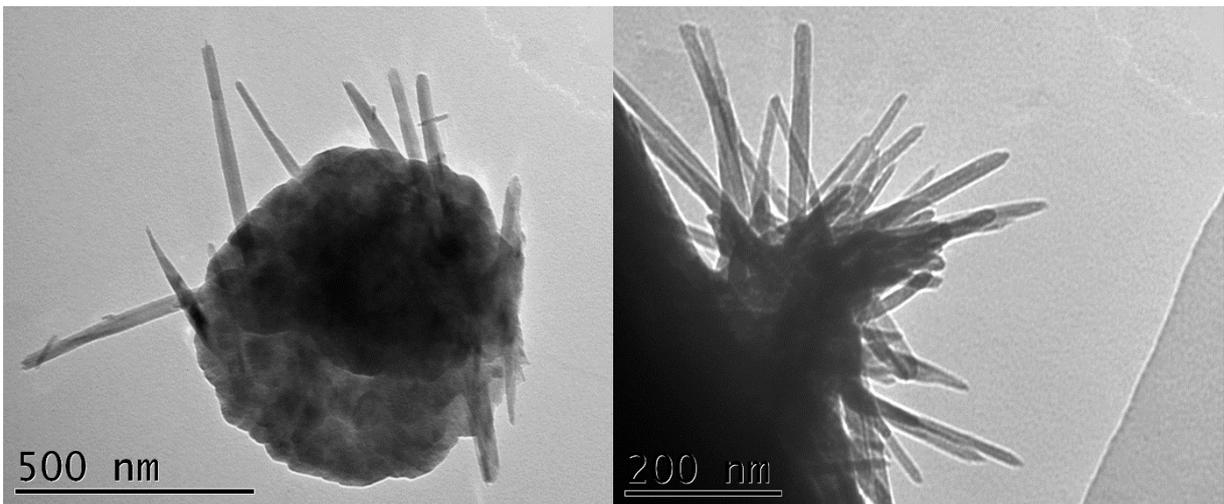
Na Figura 25, no espectrograma do biocimento, pode-se observar os mesmos picos de  $\text{PO}_4$  que estavam presentes na hidroxiapatita antes do tratamento térmico para obtenção do biocimento. Estes são observados nas bandas  $560 \text{ cm}^{-1}$  e  $1020 \text{ cm}^{-1}$ . Além destes, ocorre um pico a  $2400$  característico da presença de  $\text{CO}_2$  e outras bandas de vibrações entre  $3500 \text{ cm}^{-1}$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$  demonstrando a presença de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Importante destacar que resultados semelhantes a estes já foram encontrados nos trabalhos de Franczak *et al.* (2017) e Lourenço (2016).

### 5.3.5 Análise morfológica do pó de biocimento por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A Figura 26 apresenta as imagens obtidas por meio de MET para identificação das características morfológicas do pó de biocimento sintetizado neste trabalho.

Figura 26 – Imagem de nanopartículas do biocimento obtido por MET



Fonte: Do autor, 2023.

A Figura 26 ilustra que após o processo do tratamento térmico do fosfato de cálcio ocorre a formação do biocimento. As imagens da micrografia apresentam uma morfologia formada por finos fragmentos de cristais de fosfatos de cálcio na forma de agulhas aglomerados.

A presença de cristais de fosfato de cálcio, como observado na Figura 26, são desejáveis, pois eles são bioativos, ou seja, têm a capacidade de interagir com os tecidos biológicos circundantes e, assim, promover a formação e o crescimento de novo tecido ósseo. Salienta-se ainda que o biocimento de fosfato de cálcio é um composto que possui uma estrutura cristalina natural, o que significa que suas moléculas têm uma organização regular e repetitiva em forma de cristais.

A morfologia apresentada na Figura 26 corrobora com os estudos de Silva *et al.* (2017), que apresentaram morfologia semelhante na síntese de biocimentos.

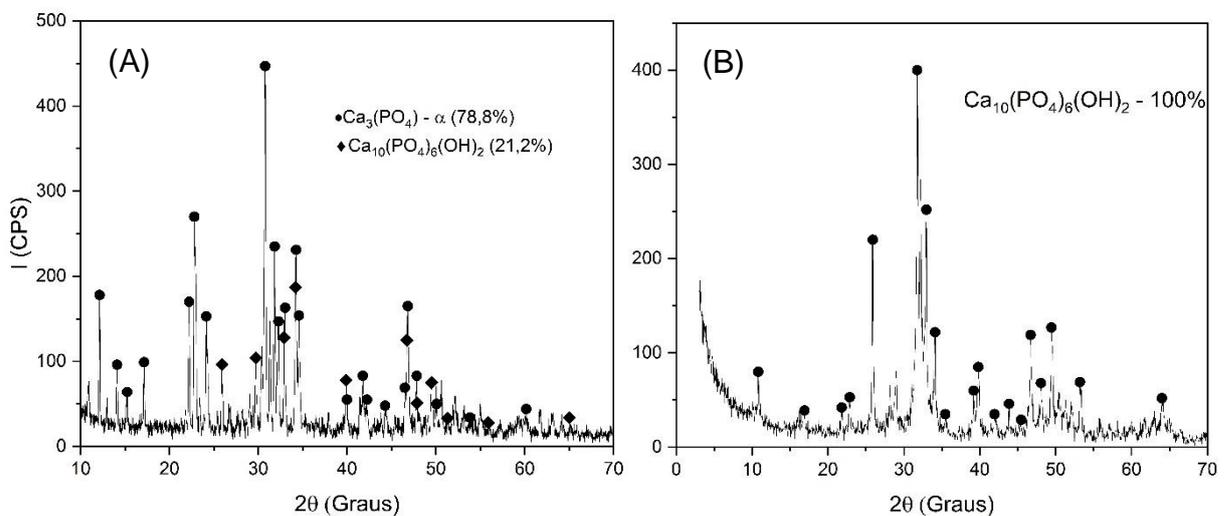
Os finos fragmentos de cristais de fosfato de cálcio aglomerados com estruturas microporosas também foram evidenciados por Franczak *et al.* (2017).

Outros estudos indicam que fosfatos de cálcio hidratados, de maneira geral, são formados por finas partículas nanométricas aglomeradas (CAMARGO; SOARES; GEMELLI, 2007; DALMÔNICO *et al.*, 2015).

### 5.3.6 Biocimento Hidratado

Como destacado anteriormente, os pós de biocimento foram hidratados com fosfato dissódico. O processo de cura do biocimento hidratado ocorreu de duas formas: temperatura ambiente (cura a seco) e temperatura controlada e com umidade (cura úmida); nesta forma de cura as amostras foram colocadas em uma estufa com temperatura controlada a 37,5 °C. A Figura 27(A) ilustra o DRX do biocimento com cura a seco, enquanto a Figura 27(B) apresenta o DRX do biocimento com cura úmida. As amostras encaminhadas para dos DRXs possuíam 28 dias de cura.

Figura 27 – Difratoograma de Raio X do biocimento hidratado: (A) cura a seco e (B) cura úmida.



Fonte: Do autor, 2023.

Como observado na Figura 27(A), o biocimento após a hidratação com fosfato de dissódico e curado por cura a seco não apresentou fases diferentes em relação ao pó de biocimento não hidratado. Assim, é evidente que após a hidratação por cura a seco, o biocimento mantém as fases do biocimento não hidratado, com uma porcentagem de 21,2% de HPA e 78,8% de fosfato de cálcio *alpha*. Apenas água + fosfato dissódico não foi suficiente para desencadear a formação de fases

hidratadas no biocimento. Nas condições de cura a seco, as fases presentes no biocimento, conforme apresentado neste estudo, são semelhantes aos resultados obtidos por Franczak *et al.* (2017).

Em outras palavras, as fases identificadas não sofreram alterações após a hidratação. Não foram formados novos cristais, o que pode estar relacionado à relação líquido/pó que foi insuficiente para a precipitação e cristalização de novas fases (FRANCZAK *et al.*, 2017; MEDVECKY *et al.*, 2021). Por outro lado, para o biocimento hidratado, curado por cura úmida, a principal mudança estrutural que ocorre com a hidratação é a transformação do *alpha*-TCP em HPA, ou seja, a presença de uma única fase, HPA. Essa fase é ilustrada na Figura 27(B), onde foram identificados os picos característicos de HPA. A formação de HPA ocorreu devido à interação entre o líquido e os íons de cálcio e fosfato presentes no biocimento durante a hidratação. Nessa reação, os íons de cálcio e fosfato reagem para formar cristais de HPA. A presença de umidade é um fator crucial para a formação de novos cristais de HPA, pois estende o tempo de hidratação do biocimento (MEDVECKY *et al.*, 2021; RICHTER *et al.*, 2023).

Possivelmente, nenhuma alteração de fase ocorreu no biocimento curado a seco devido ao fato de que as condições de umidade do ambiente podem ter sido insuficientes para que as reações do processo de hidratação ocorressem (SIDDIQUE; MEHTA, 2014). Por outro lado, a cura úmida favoreceu a formação de uma única fase de HPA. Biocimentos, quando misturados com uma fase líquida, formam uma pasta plástica capaz de solidificar. O processo de solidificação ocorre por meio da reação exotérmica de hidratação e endurecimento do biocimento. Um ambiente úmido promove a supersaturação da solução, favorecendo a precipitação de HPA. Quando o biocimento é exposto ao processo de cura em um ambiente úmido, íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{OH}^-$  são liberados, promovendo a supersaturação da solução, levando à precipitação de HPA nas superfícies das partículas (OLIVEIRA; PANDOLFELLI; JACOBOWITZ, 2010). Após o processo de cura, a formação de HPA aumentou para 100%.

#### 5.4 BIOCIMENTOS – COMPÓSITOS

Com o objetivo de analisar o comportamento do material no que se refere ao comportamento mecânico e a entrega de medicamentos, foram preparadas 4 composições diferentes de biocimento. Neste trabalho essas composições foram

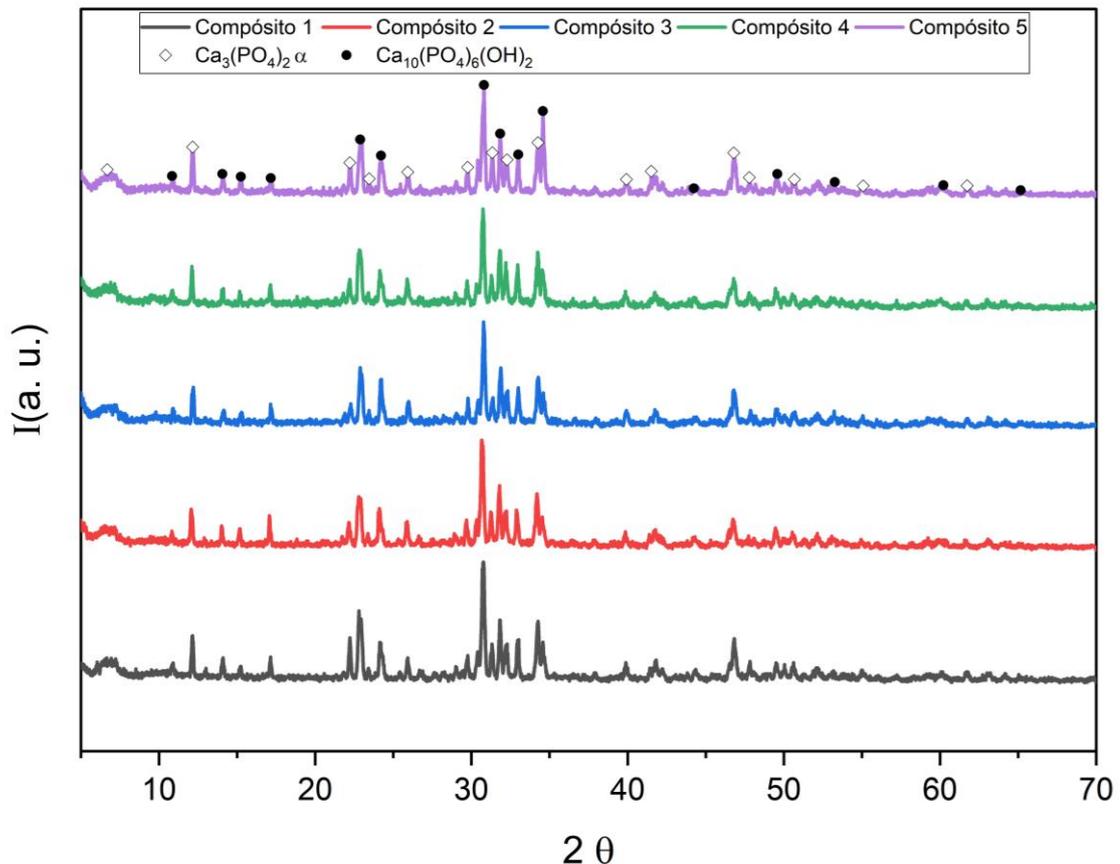
denominadas compósito 1, 2, 3 e 4. Estas amostras receberam diferentes proporções de nanopartículas de sílica, com o objetivo de investigar o comportamento mecânico e a entrega de fármacos pelo material.

### 5.5 COMPÓSITO HIDRATADO

Conforme destacado anteriormente, após a obtenção, os pós de biocimento foram utilizados para a síntese de 4 compósitos, com diferentes percentuais de adição de nanopartículas de sílica. Posteriormente esses compósitos foram hidratados com fosfato dissódico e levados ao processo de cura. No processo de cura foram utilizados dois métodos: cura a seco e cura úmida.

Todos os compósitos nas duas diferentes formas de cura passaram pelo ensaio de caracterização de DRX. A Figura 28 demonstra o difratograma de raios X obtido sobre os cinco compósitos de biocimento com cura a seco após 28 dias.

Figura 28 – Difratograma de raios X dos compósitos de biocimento com cura a seco.

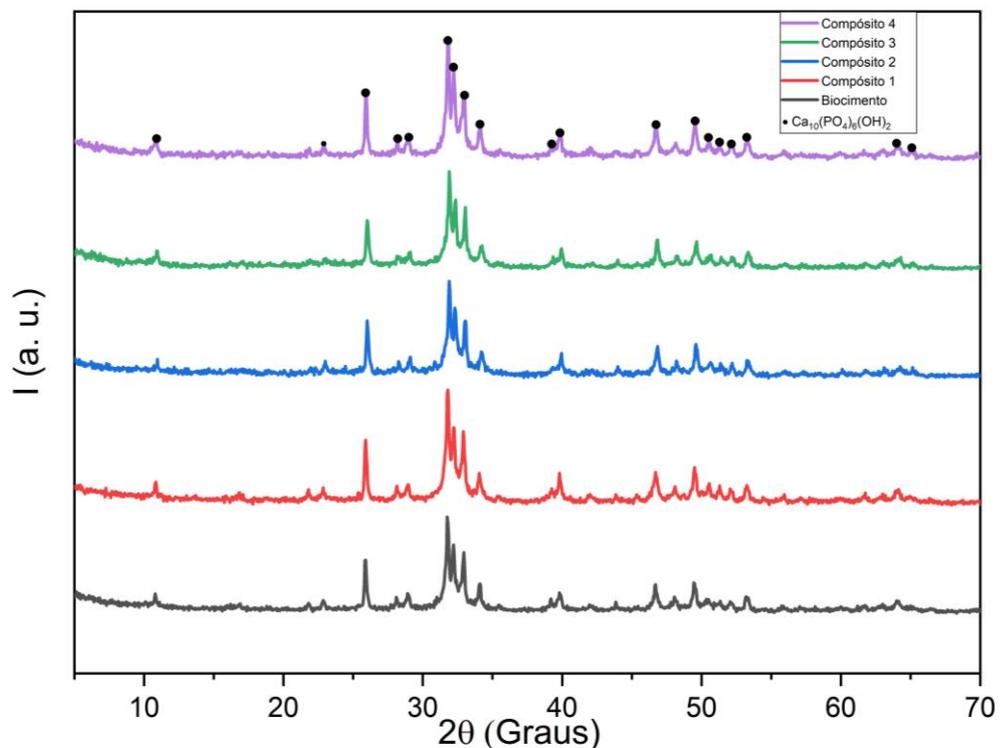


Fonte: Do autor, 2023.

Na Figura 28 pode-se observar a presença de biocimento constituído de fosfato de cálcio *alpha* e hidroxiapatita em todas as amostras apresentadas. Contudo observa-se que o pico de fosfato de cálcio em 31° diminui de intensidade com a inserção de nanopartículas de sílica com relação ao apresentando no biocimento, que apresenta aproximadamente um pico de 420 contagens. Nos demais compósitos, à medida que são inseridos proporcionalmente nanopartículas de sílica na composição total, a intensidade dos picos diminui. O compósito 1 apresenta intensidade de aproximadamente 420 contagens, no compósito 2 aproximadamente 400 contagens, no compósito 3 abaixo de 400 contagens e no compósito 4 como o percentual de nanopartículas de sílica é de somente 1% com relação a massa total apresenta intensidade de aproximadamente 420 contagens.

Além dos compósitos de biocimento com cura em temperatura ambiente, a Figura 29 ilustra os DRXs dos compósitos com cura em temperatura controlada e umidade para cada um dos compósitos após o período de 28 dias de cura.

Figura 29 – Difratoograma de raios X dos compósitos de biocimento sintetizados com umidade e temperatura controladas.



Fonte: Do autor

Assim como nos compósitos com cura a seco, os compósitos com cura úmida também apresentaram o mesmo padrão de DRX, ou seja, todos os compósitos que foram submetidos a cura úmida apresentaram fase de hidroxiapatita. Esta fase é ilustrada nas imagens da Figura 29.

Conforme pode ser observado nas Figuras 28 e 29, a presença de nano-sílica em diferentes porcentagens em cada compósito não foi suficiente para a formação de novas fases no biocimento. As fases presentes em cada compósito permaneceram inalteradas mesmo com a adição de nanopartículas de sílica.

Além do ensaio de difração de raios X, foi realizado o ensaio de BET. A Tabela 6 apresenta além da área superficial, o volume e o raio dos poros do biocimento e de cada um dos 4 compósitos sintetizados neste estudo.

Tabela 6 – Área superficial (ABET), volume (VPBJH) e raio (RPJH) dos compósitos de biocimentos

<b>Amostra</b>	<b>ABET (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>VPBJH (c<sup>2</sup>/g)</b>	<b>RPBJH (Å)</b>
Biocimento	21,101	0,120	21,115
Compósito 1	24,107	0,154	21,116
Compósito 2	22,672	0,129	21,178
Compósito 3	21,372	0,110	21,212
Compósito 4	26,207	0,166	52,671

Fonte: Do autor, 2023

Por meio da Tabela 6, pode-se observar que os compósitos não apresentaram aumento significativo de área superficial e no volume dos poros com a adição de nanopartículas de sílica.

Porém, no que se refere ao raio de poro, o compósito 4 apresentou um raio de poro aproximadamente 150% maior do que o dos demais compósitos. Esse fato deve estar relacionado com a alta área superficial das nanopartículas de sílica mesoporosa obtida pela rota 2. Os demais compósitos apresentaram resultados semelhantes ao pó de biocimento, ou seja, não obtiveram aumento significativo de raio de poro.

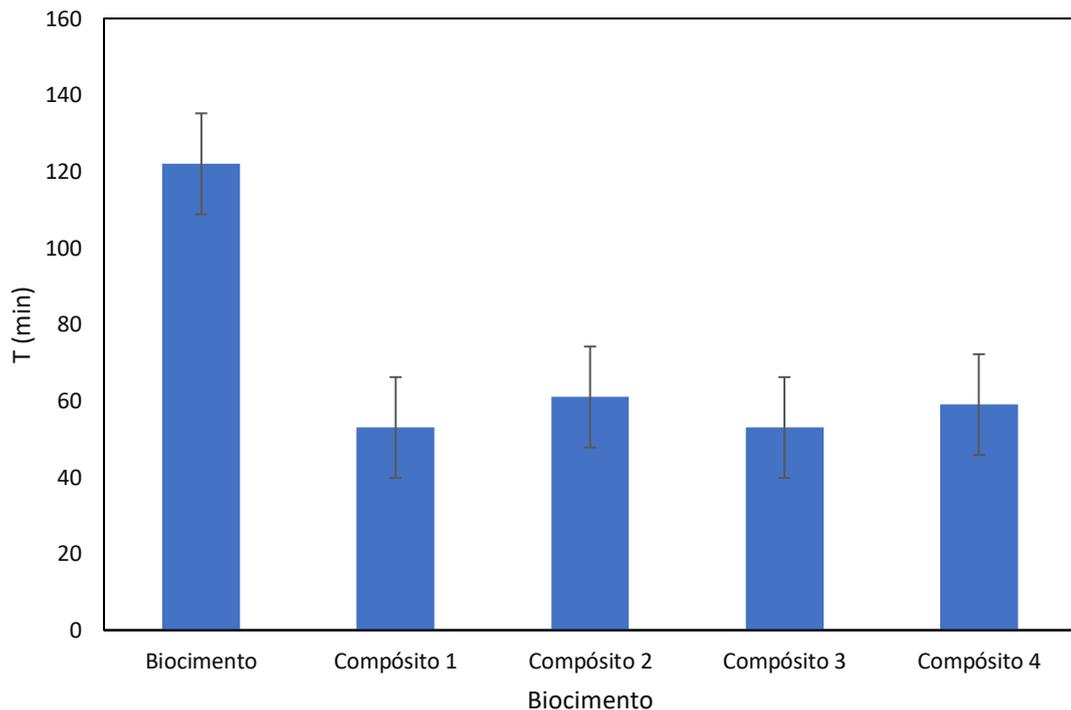
A nanopartículas de sílica se destacam por sua capacidade de interagir com outros materiais, como a hidroxiapatita presente nos biocimento. Essa adição possivelmente resultou na formação de gel e adsorção na matriz do cimento,

aumentando a rugosidade e área superficial e o volume de poros do biocimento. Em contrapartida o excesso de nanopartículas de sílica em um biocimento pode causar aglomeração de partículas, prejudicando a distribuição no cimento e reduzindo a área superficial. Além disso adições exageradas podem também densificar a matriz cimentícia, diminuindo a porosidade e a área superficial.

### 5.5.1 Ensaio de cura do biocimento e dos compósitos estudados

Com o intuito de analisar o tempo de pega foram realizados ensaios com os 4 compósitos de biocimento com cura a seco. A Figura 30 apresenta as cinco amostras com o tempo final de pega cada uma delas.

Figura 30 – Ensaio de tempo de pega das cinco amostras hidratadas de biocimento e dos compósitos estudados.



Fonte: Do autor, 2023.

Na Figura 30 pode-se perceber que a inserção da sílica nos compósitos incidiu diretamente no tempo de pega do biocimento independentemente do tipo. No biocimento o tempo de pega final é de 120 min enquanto nos compósitos 1, 2, 3, e 4

que possuem nanopartículas de sílica na sua composição o tempo é de menos de 60 m.

Uma possível resposta para o tempo de pega final de todos os compósitos estarem acima de 50 min refere-se a razão líquido/pó. A redução no tempo de cura dos compósitos com a adição das nanopartículas de sílica ocorre porque esta pode aumentar a taxa de hidratação do biocimento, promovendo a formação mais rápida de ligações químicas entre as partículas do material. Além deste fato as nanopartículas de sílica podem atuar como nucleador, promovendo a formação de cristais de fosfato de cálcio e acelerando o processo de endurecimento do biocimento (BANDYOPADHYAY; BOSE, 2013; MOREJÓN-ALONSO; CARRODEGUAS; DOS SANTOS, 2011).

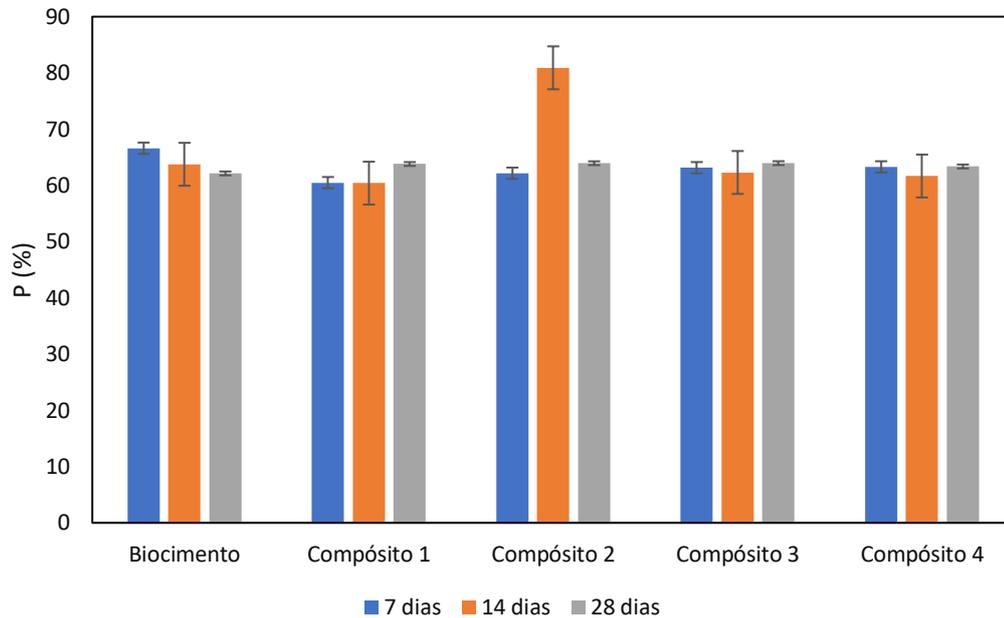
Boroujeni *et al.* (2014) e Tariq *et al.* (2019) destacaram que o tempo final de pega para biocimentos são de 5 a 40 min. Porém estas pesquisas utilizaram agulhas de Gillmore para a determinação do tempo de pega, conforme norma ASTM C266-89.

No entanto Zanelato *et al.* (2020) utilizaram a norma ABNT NBR 16607 de agulha de Vicat, como a utilizada nesta pesquisa e o tempo de pega final encontrado foi superior a 3 h.

### **5.5.2 Ensaio de porosidade**

Para a realização do ensaio de porosidade, foram utilizados 9 corpos de prova de cada uma das 5 amostras, totalizando 45 corpos de prova neste experimento. Desta forma três corpos de prova por amostra foram pesados e medidos no período de 7, 14 e 28 dias. Na Figura 31 pode-se observar o resultado de porosidade. O ensaio de porosidade foi realizado com os compósitos curados a temperatura ambiente.

Figura 31 – Porosidade dos compósitos de biocimento nos períodos de 7, 14 e 28 dias.



Fonte: Do autor, 2023.

A Figura 31 apresenta o resultado de porosidade nos tempos de cura de 7, 14 e 28 dias para o biocimento e cada um dos quatro compósitos de biocimento estudados. De uma forma geral o ensaio de porosidade apresentado na Figura 31 apresenta um padrão estável para os compósitos 1, 3 e 4 no período de variação de cura do biocimento. Destaca-se que todos os compósitos ao final dos 28 dias de cura apresentam uma porosidade de aproximadamente 63%. A amostra de biocimento apresenta uma leve diminuição de porosidade com o passar do tempo. Com relação ao compósito 2 que apresenta em sua composição 10% da massa de nanopartículas de sílica e o restante de biocimento de hidroxiapatita, ocorreu um pico de porosidade no 14º dia de cura retornando no final do dia 28º ao padrão do dia 7.

Destaca-se que uma elevada porosidade é um fator favorável para osteocondução, que permite o crescimento celular e circulação de fluidos no interior dos poros (LEGEROS, 2008; SYCH *et al.*, 2014).

Em contrapartida, a porosidade tem um comportamento inverso no que se refere à resistência mecânica à compressão. Os vazios presentes no material mais poroso tendem a influenciar negativamente na resistência mecânica (CARDOSO; MOTISUKE; ZAVAGLIA, 2012).

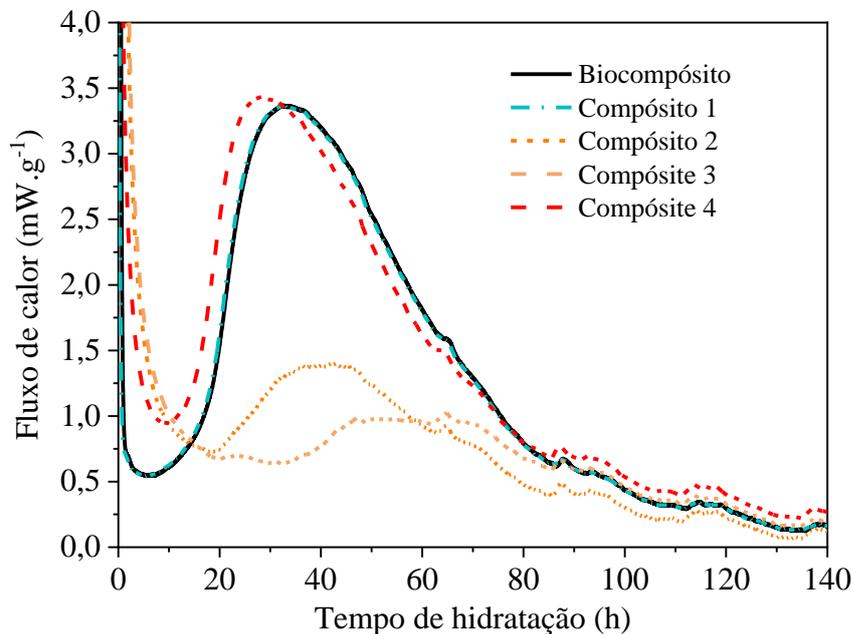
Nos trabalhos de Almeida (2018), Camargo, Soares e Gemelli (2007) e Khan *et al.* (2014) fica evidente que o aumento da porosidade diminui a resistência mecânica do material. Na Figura 31 é apresentado o resultado do ensaio de porosidade dos compósitos, que pouco variam ao final de 28 dias, demonstrando assim que a porosidade não prejudicou a resistência mecânica dos materiais; desta forma, fica evidente que o aglomeramento de partículas é que evidenciou a baixa na resistência mecânica.

### **5.5.3 Calorimetria de condução isotérmica**

O estudo da calorimetria desempenha um papel fundamental na investigação da hidratação de biocimentos enriquecidos com nanopartículas de sílica. Ao monitorar a liberação de calor durante o processo de hidratação, é possível controlar a cinética da reação, otimizar a formulação do biocimento e avaliar o impacto das nanopartículas de sílica na taxa de hidratação.

A Figura 32 ilustra o fluxo de calor em função do tempo de hidratação obtido por meio do ensaio de calorimetria de indução isotérmica. Pode-se observar que o Compósito 1, que contém 5% de nanopartículas de sílica, apresenta um comportamento semelhante a amostra de biocimento. Enquanto isso, os compósitos 2 e 3, que contêm 10% e 15% de nanopartículas de sílica, respectivamente, exibem uma redução significativa no fluxo de calor proporcional ao teor de nanopartículas de sílica.

Figura 32 - Fluxo de calor em função do tempo de hidratação das composições a partir do ensaio de calorimetria de indução isotérmica.



Fonte: Do autor, 2023.

A adição de nanopartículas de sílica ao *alpha*-TCP pode ter efeitos complexos no calor de hidratação. A alta área de superfície e a reatividade das partículas de *alpha*-TCP podem resultar em uma taxa de hidratação mais elevada e maior liberação de calor. Isso ocorre porque as nanopartículas de sílica atuam como sítios de nucleação para a formação de HPA, promovendo o crescimento de uma camada uniforme e densa de HPA na superfície do compósito.

No entanto, as nanopartículas de sílica também podem funcionar como dissipadores de calor, dispersando o calor gerado durante o processo de hidratação e reduzindo o aumento da temperatura. Esse fenômeno ocorre quando o teor de nanopartículas de sílica excede um determinado limite, levando à aglomeração de partículas e formação de aglomerados, o que reduz a quantidade de calor gerado durante a reação (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Os resultados da calorimetria isotérmica (Figura 32) sugerem que esse segundo fenômeno é mais provável quando o teor de nanopartículas de sílica excede 5%. Esse fenômeno está associado ao chamado "efeito de diluição", que ocorre quando o  $\alpha$  ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) é excessivamente substituído pelas nanopartículas de sílica (SILVA *et al.*, 2017).

Por outro lado, a adição de 1% de nanopartículas de sílica da rota 2 (Compósito 4) demonstrou um aumento na taxa de reação e liberação de calor. A alta área superficial e estrutura porosa da sílica mesoporosa facilitam a adsorção de íons de cálcio e fosfato, levando à formação de núcleos de hidroxiapatita (HAP) e ao subsequente crescimento da camada de HPA na superfície das partículas de *alpha*-TCP. Isso acelera a taxa de reação e aumenta a liberação de calor.

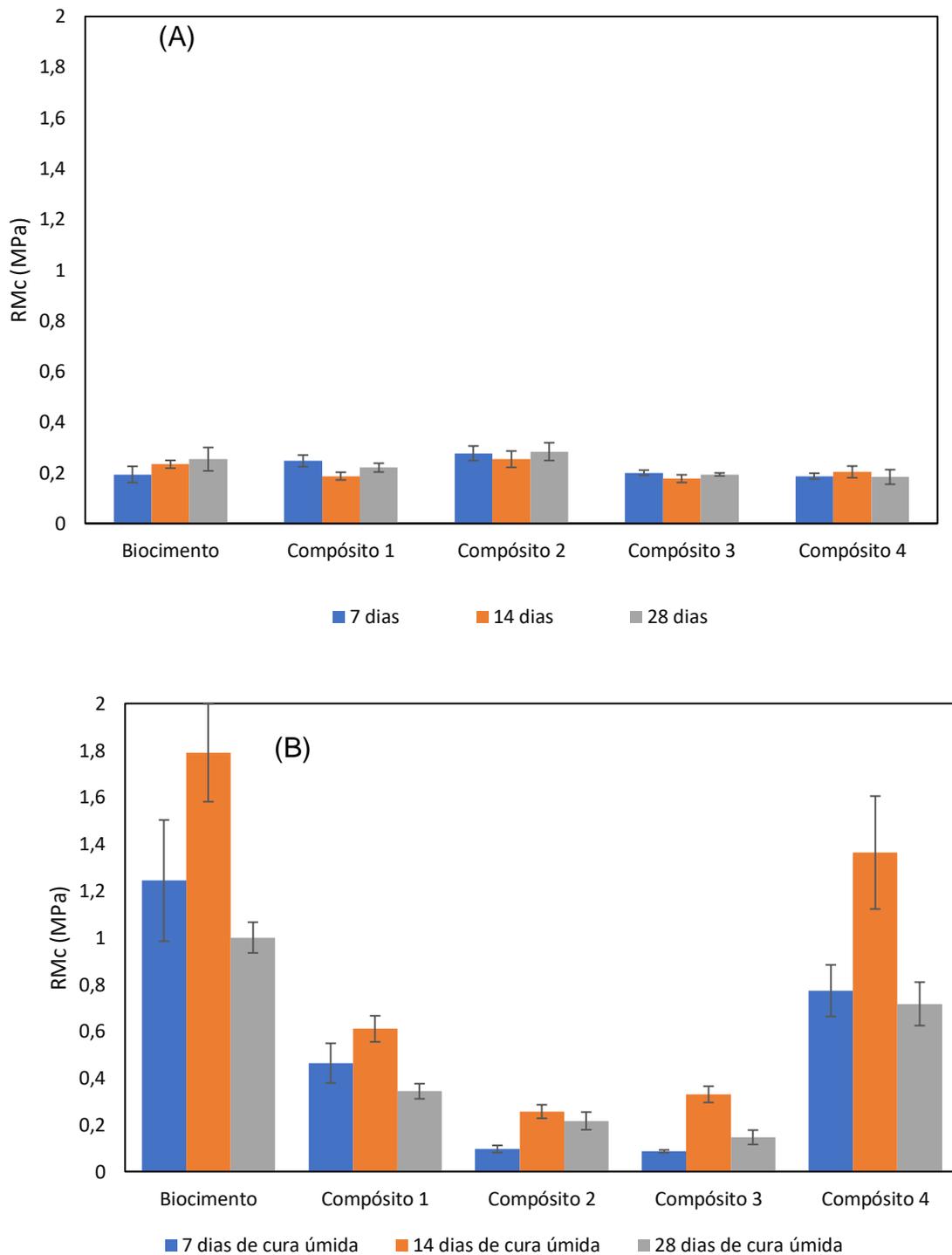
#### **5.5.4 Ensaio resistência mecânica à compressão diametral**

Paralelamente ao ensaio de calorimetria, as cinco formulações de compósitos neste estudo foram submetidas a testes de compressão diametral. Com o objetivo de aumentar a resistência mecânica dos biocimentos de hidroxiapatita, pode-se adicionar quantidades pequenas de uma segunda fase na matriz de hidroxiapatita no momento da elaboração do compósito de biocimento.

Desta forma por tratar-se de um material frágil, o ensaio de compressão diametral é o mais adequado para quantificar a resistência mecânica de um biocimento. Todas as formulações dos cinco compósitos desta pesquisa foram submetidas a testes de compressão diametral. As amostras foram preparadas em lotes de 3 (cada) compósitos e ensaiadas após o tempo de cura de 7, 14 e 28 dias.

A Figura 33(A) apresenta os resultados de resistência mecânica à compressão diametral com cura a seco, enquanto a Figura 33(B) apresenta os resultados para o mesmo ensaio, porém foram submetidas a cura úmida e temperatura de 37,5°C.

Figura 33 – Resistência mecânica no ensaio de compressão diametral dos compósitos de biocimento nos períodos de 7, 14 e 28 dias: (A) cura a seco e (B) cura úmida.



Fonte: Do autor, 2023.

Conforme mostra a Figura 33(A), pode-se perceber que, estatisticamente, os valores de resistência mecânica à compressão são todos iguais. Desta forma não

foi possível identificar aumento ou diminuição da resistência mecânica para o biocimento e os compósitos estudados.

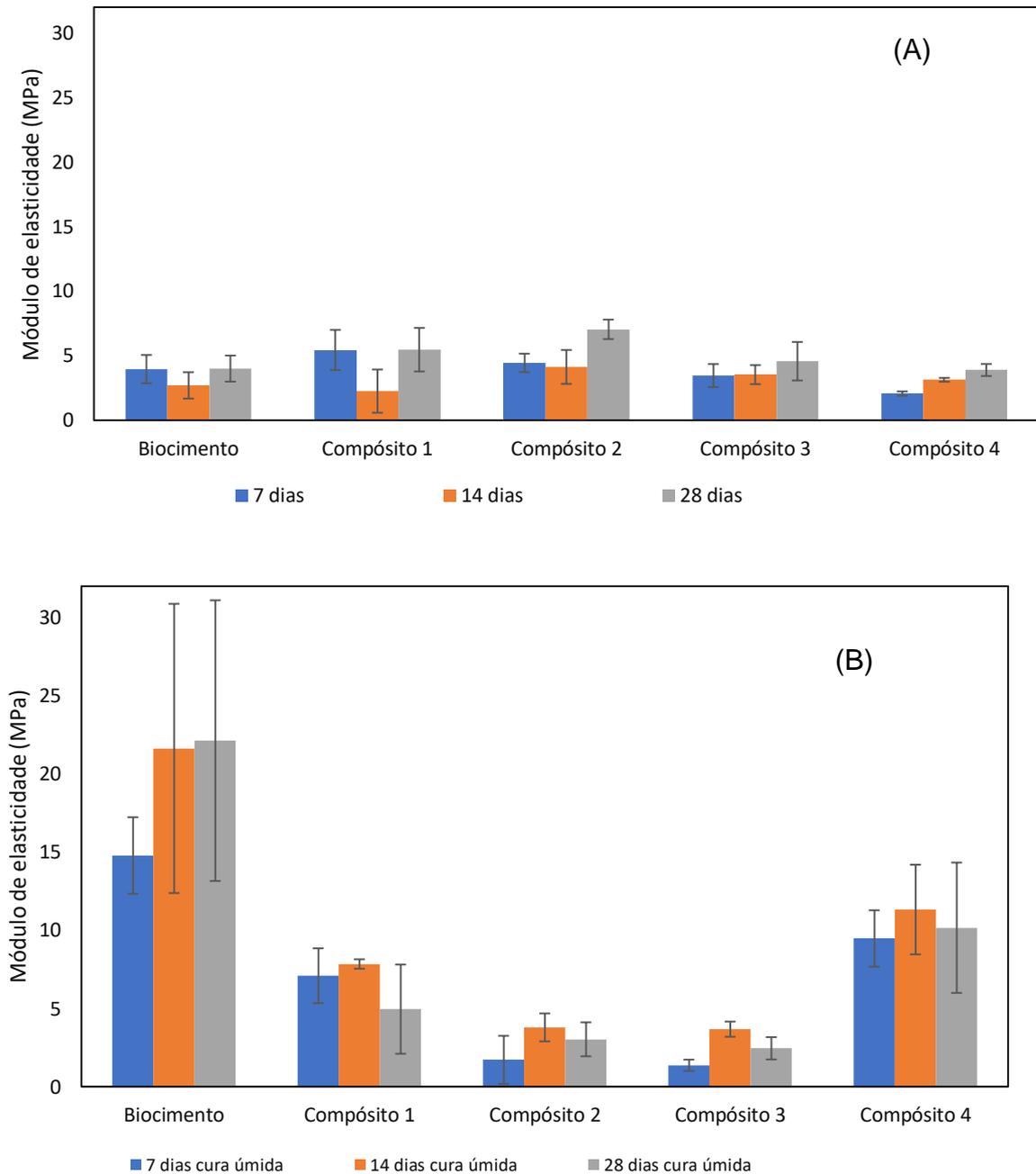
Com o propósito de simular condições de cura no corpo humano, os compósitos de biocimento foram preparados novamente, mas desta vez foram deixados para secar em um forno a 37,5 °C, em cura úmida. Após períodos de cura de 7, 14 e 28 dias, os compósitos foram submetidos novamente a testes de resistência à compressão, e os resultados foram apresentados na Figura 33(B).

Na Figura 33(B), pode-se perceber que ao final de 28 dias, a resistência mecânica para o biocimento e os demais compósitos com cura úmida não apresentaram alterações, ou seja, estatisticamente ficaram iguais. Porém, é importante destacar, que quando o compósito apresenta um valor maior de 5% de adição de nanopartículas de sílica em sua massa total, casos dos compósitos 2 e 3; foi possível identificar uma diminuição na resistência mecânica, com relação ao biocimento. Esses resultados corroboram com os ensaios de calorimetria.

#### **5.5.5 Módulo de elasticidade**

O módulo de elasticidade é a razão entre uma tensão aplicada sobre um corpo e a deformação específica imediata nele verificada. Com o objetivo de analisar a deformação dos compósitos estudados na pesquisa, foi utilizado este ensaio nas amostras curados em temperatura ambiente e controlada. A Figura 34(A) apresenta o resultado deste ensaio para os compósitos com a cura a seco, enquanto a Figura 34(B) apresenta a o resultado deste ensaio para os compósitos com cura úmida.

Figura 34 – Módulo de elasticidade dos compósitos de biocimento nos períodos de 7, 14 e 28 dias.



Fonte: Do autor, 2023.

Com relação aos valores do módulo de elasticidade observados na Figura 34(A), observa-se um comportamento semelhante ao ensaio de compressão diametral para cura seca, ou seja, os valores do módulo de elasticidade do biocimento e dos compósitos não apresentaram aumento ou diminuição.

. Da mesma forma, os resultados evidenciados na Figura 34(B) para o módulo de elasticidade dos compósitos de biocimento com cura úmida, apresentaram resultados semelhantes a resistência mecânica à compressão. Fica evidente que a adição de nanopartículas de sílica até 5% na massa total do biocimento, incidem no módulo de elasticidade do material, reduzindo seu valor. O biocimento e os compósitos 1, 2, 3 e 4 apresentaram respectivamente 22,12, 4,95, 3,02, 2,45 e 10,16 MPa no final de 28 dias.

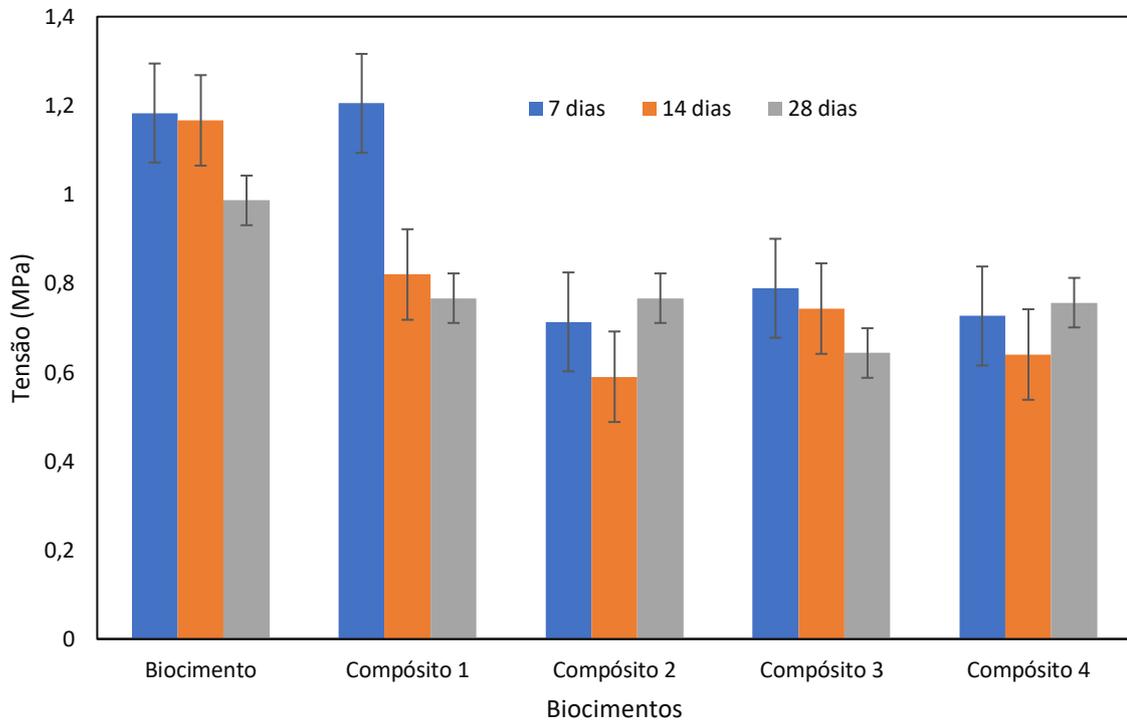
Madureira *et al.* (2020) desenvolveram uma síntese de biocimentos de fosfato de cálcio hidratados com fosfato dissódico. Os resultados para o módulo de elasticidade apresentaram os valores de 7,3 MPa. O autor ainda relata que a resistência à flexão e a rigidez do tecido ósseo pode ter valores diferentes para os diferentes ossos do corpo.

Cabe destacar que quanto maior o módulo de elasticidade do material menor será a deformação elástica resultante da aplicação de uma tensão (GARCIA; SPIM; SANTOS C. A, 2015). Os resultados mostram que o módulo de elasticidade do material foi maior que o esperado.

#### **5.5.6 Ensaio de flexão**

O ensaio de flexão também foi utilizado para analisar o comportamento mecânico dos biocimentos, por meio da Figura 35 pode-se observar o comportamento dos biocimentos com cura a seco.

Figura 35 – Ensaio de Flexão para os compósitos de biocimentos com cura a seco nos períodos de 7, 14 e 28 dias.



Fonte: Do autor, 2023.

No ensaio de flexão apresentado na Figura 35 fica evidenciado que a amostra de biocimento e os compósitos 1 e 3 com o passar do tempo de cura diminuem sua resistência à flexão de forma linear. Como anteriormente mencionado a amostra de biocimento refere-se ao biocimento de hidroxiapatita sem adição de nanopartículas de sílica e os compósitos 1 e 3, com a adição de 5 e 15% de nanopartículas de sílica na massa total do biocimento. Os compósitos 2 e 4 apresentam um comportamento diferente ao final dos 28 dias de cura, o material apresenta um leve aumento na resistência à flexão com relação a 7 dias de cura.

Este comportamento já foi encontrado no trabalho de Lourenço (2016), que salienta que este resultado está ligado a existência de defeitos muito pequenos presentes no material, os quais servem como fatores de concentração de tensões.

Com relação aos valores encontrados no que se refere ao ensaio de flexão, pode-se perceber que quanto maior o tempo de cura do compósito menor a resistência a flexão, contudo a resistência à flexão também diminui quando ocorre a inserção das nanopartículas de sílica no biocimento. A amostra de biocimento apresenta o maior

valor encontrado ao final de 28 dias de cura, com 1,18 MPa, os demais compósitos apresentam um valor de aproximadamente 0,7 MPa para a resistência à flexão.

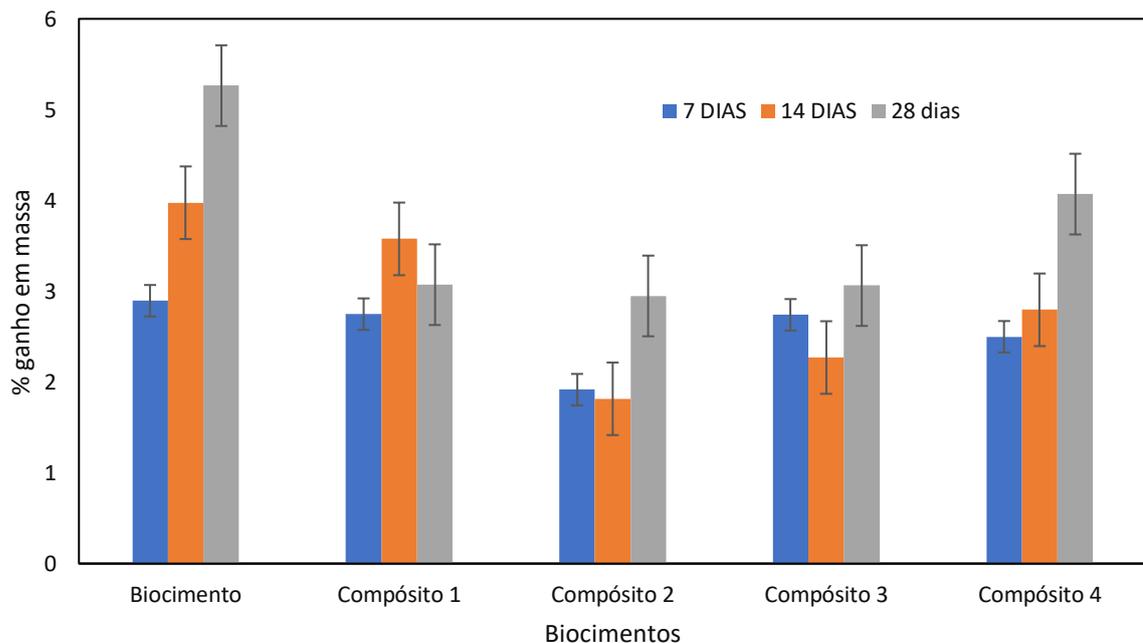
O osso cortical apresenta resistência à flexão entre 50 e 150MPa, enquanto o osso esponjoso tem resistência à flexão entre 1,2 e 20 MPa (AJAXON *et al.*, 2017; LOPEZ-HEREDIA *et al.*, 2011).

Os resultados apresentados nesta pesquisa evidenciam que o compósito apresenta o valor dentro da faixa de resistência à flexão do osso esponjoso, os demais compósitos com a adição de nanopartículas de sílica não obtêm a resistência à flexão desejada.

### 5.5.7 Ensaio de Fluido corporal simulado (SBF)

Para avaliar a bioatividade dos compósitos estudados após a cura úmida, as amostras foram colocadas em exposição ao fluido corporal simulado (SBF). A Figura 36 ilustra o resultado do ensaio de SBF para todos os compósitos de biocimento.

Figura 36 – Ensaio de fluido corporal simulado (SBF) nos períodos de 7, 14 e 28 dias.



Fonte: Do autor, 2023.

O ganho de massa de biocimento em uma solução de SBF é uma medida do grau de bioatividade do material. Esse ganho de massa representa uma medida de quão bem o biocimento reage com a solução e forma uma camada de hidroxiapatita. Na Figura 36 fica evidente o aumento de massa ao longo de 28 dias, esse ganho de massa pode ser atribuído à absorção de íons presentes na solução, como cálcio e fosfato, pela estrutura porosa do biocimento. Esse fenômeno indica a formação de uma camada superficial de hidroxiapatita precipitando na amostra. Essa alteração no peso da amostra demonstra uma bioatividade do biocimento.

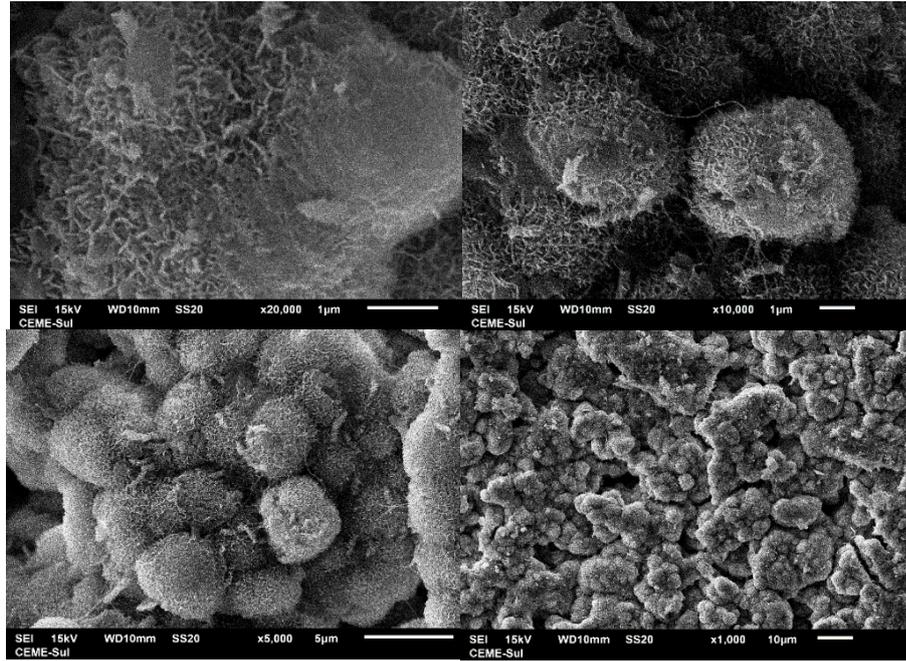
As pesquisas de (Dorozhkin (2013), Mohammadi *et al.* (2014) e Sadeghzade *et al.* (2022), encontraram resultados semelhantes da formação de apatita após exposição a uma solução de SBF e corroboram com os resultados apresentados nesta pesquisa.

#### 5.5.7.1 Análise morfológica dos compósitos de biocimento por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A bioatividade do biocimento é um fator crítico para o sucesso de sua aplicação na medicina regenerativa, especialmente no contexto do tratamento da osteoporose. A capacidade do biocimento enriquecido com sílica de interagir com fluidos corporais simulados e desencadear processos de formação de hidroxiapatita é indicativa de sua capacidade de imitar a matriz óssea natural e promover a regeneração óssea. Além disso, essa avaliação *in vitro* pode identificar possíveis efeitos adversos, como citotoxicidade, que são cruciais para garantir a segurança e eficácia do biocimento antes de sua aplicação clínica.

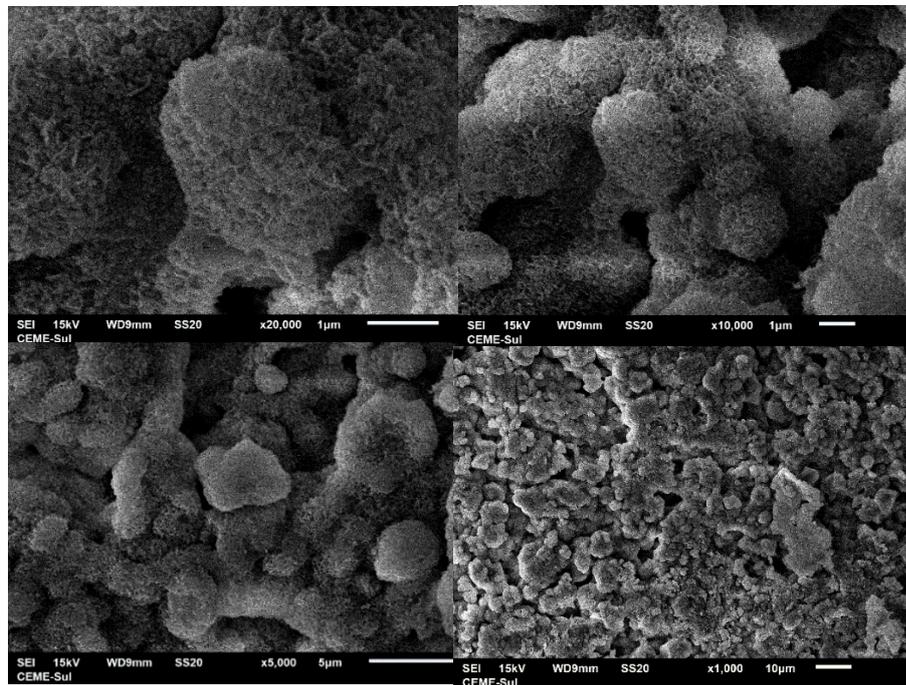
Os corpos de prova de cada compósito de biocimento foram colocados no fluido corporal simulado por 28 dias, depois deste período as amostras foram recolhidas e colocados para secar. Após a secagem, os corpos de prova foram recobertos com ouro para serem encaminhadas o ensaio de MEV. As Figuras 37 a 41 apresentam as imagens de MEV dos biocimentos sintetizados após 28 dias de imersão em SBF.

Figura 37 – Imagem de nanopartículas do biocimento obtida por MEV.



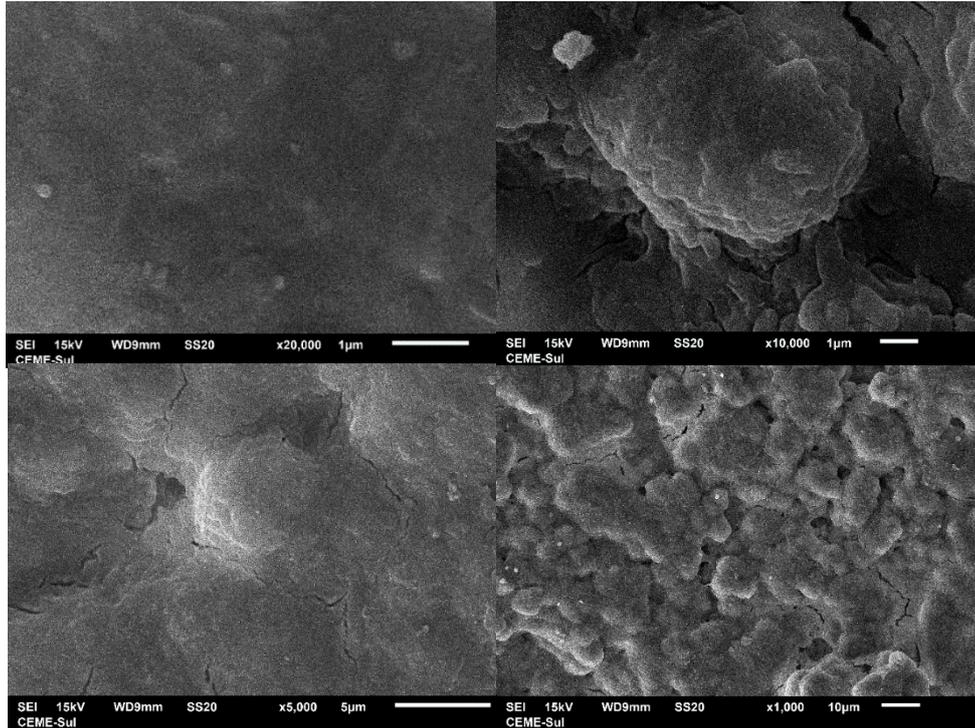
Fonte: do autor

Figura 38 – Imagem de nanopartículas do compósito 1 obtida por MEV.



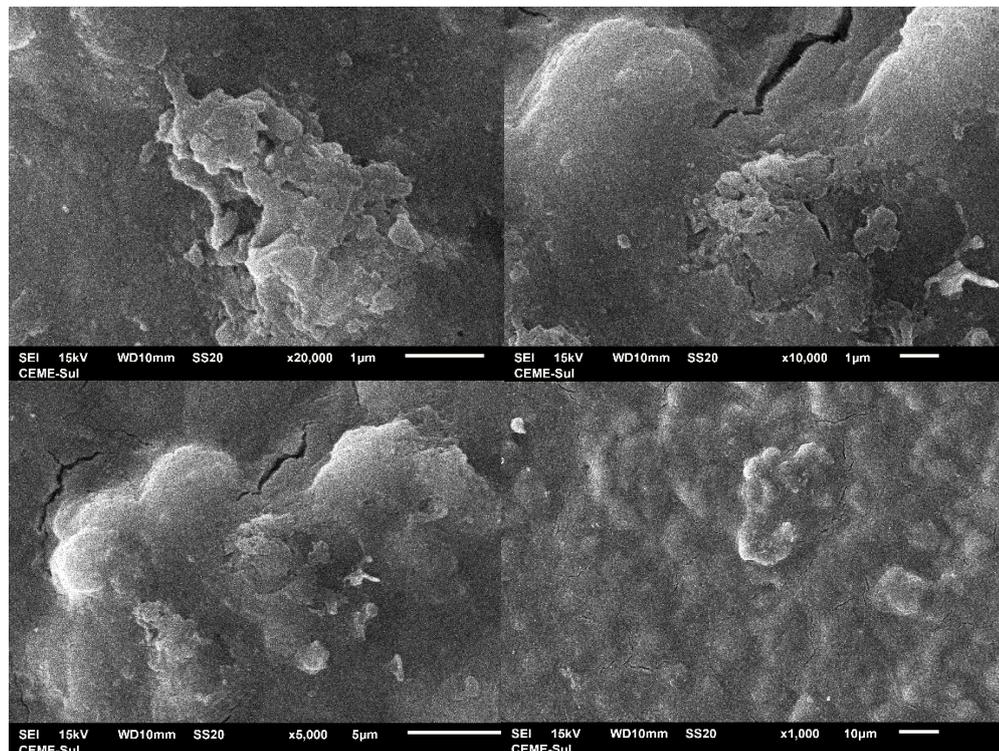
Fonte: Do autor

Figura 39 – Imagem de nanopartículas do compósito 2 obtida por MEV.



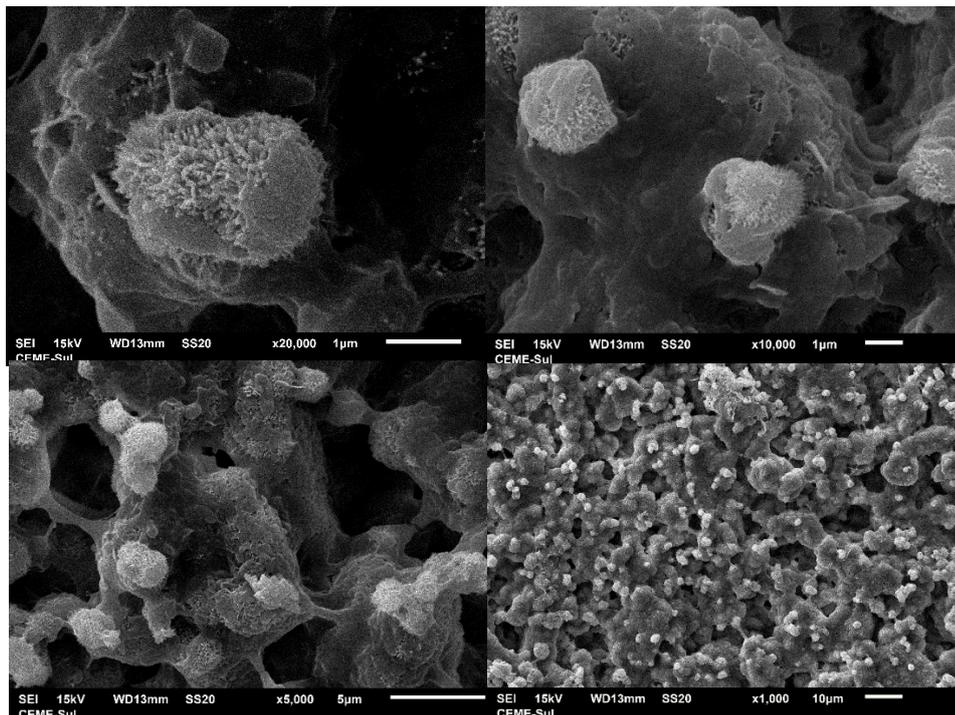
Fonte: Do autor

Figura 40 – Imagem de nanopartículas do compósito 3 obtida por MEV.



Fonte: Do autor

Figura 41 – Imagem de nanopartículas do compósito 4 obtida por MEV.



Fonte: Do autor

As imagens de MEV após a imersão em SBF demonstram que os compósitos mostraram deposição de materiais particulados, possivelmente HPA na forma de glóbulos, provavelmente derivados da solução de SBF.

Isso indica que os biocimentos estão interagindo de maneira favorável com o ambiente biológico simulado, desencadeando a deposição de hidroxiapatita, que é um dos principais componentes da matriz mineral óssea natural. Essa observação é extremamente importante em contextos de regeneração óssea e tratamento da osteoporose. A hidroxiapatita é um mineral altamente bioativo e desempenha um papel crucial na formação e resistência dos ossos. Portanto, a presença de hidroxiapatita nos biocimentos enriquecidos com sílica sugere que esses materiais têm o potencial de promover a mineralização e a regeneração óssea quando implantados no corpo humano. A formação de novos cristais de hidroxiapatita indica a capacidade do biocimento de imitar as propriedades da matriz óssea natural, o que é fundamental para a eficácia desses materiais em aplicações clínicas. Isso também indica a biocompatibilidade dos materiais.

As micrografias da superfície do biocimento, que consiste unicamente de biocimento de fosfato de cálcio, e dos Compósitos 1 e 4, que contêm uma proporção

menor de nanopartículas de sílica em sua massa total, exibiram uma estrutura cristalina mais definida, contribuindo para a bioatividade desses materiais, devido ao seu aspecto rugoso e poros bem definidos. Esse comportamento também pode ser observado nos estudos de Dalmônico *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2017).

No entanto, as imagens dos compósitos 2 e 3, que continham 10% e 15% de nanopartículas de sílica em sua massa total, mostraram um resultado diferente. Esses compósitos exibiram um material altamente aglomerado com fissuras, indicando que a adição aumentada de nanopartículas de sílica no biocimento levou a uma redução em sua resistência mecânica. Esse fato corrobora com os testes de resistência mecânica após cura úmida, uma vez que os compósitos 2 e 3 exibiram a menor resistência.

#### 5.5.7.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Neste tópico são apresentados e discutidos os resultados de FTIR das cinco amostras de biocimento hidratados nos períodos de 7, 14 e 28 dias. Cabe destacar que os compósitos durante este período ficaram submersos na solução de SBF. As Figuras 42 a 44 apresentam o resultado do FTIR para os compósitos de biocimento imersos em uma solução de SBF.

Figura 42 – Espectroscopia das cinco amostras de biocimento em 7 dias.

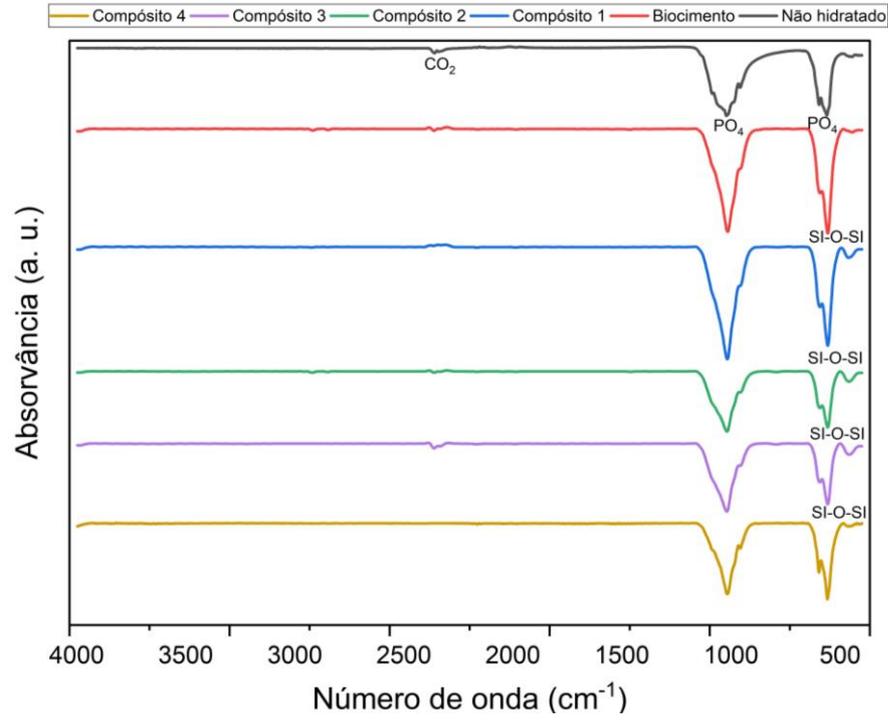


Figura 43 – Espectroscopia das cinco amostras de biocimento em 14 dias.

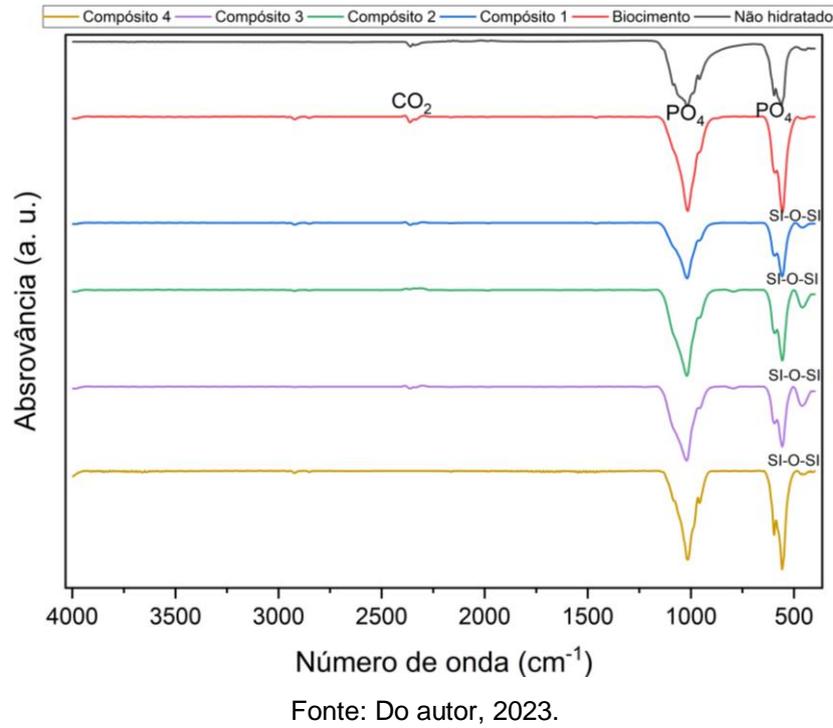
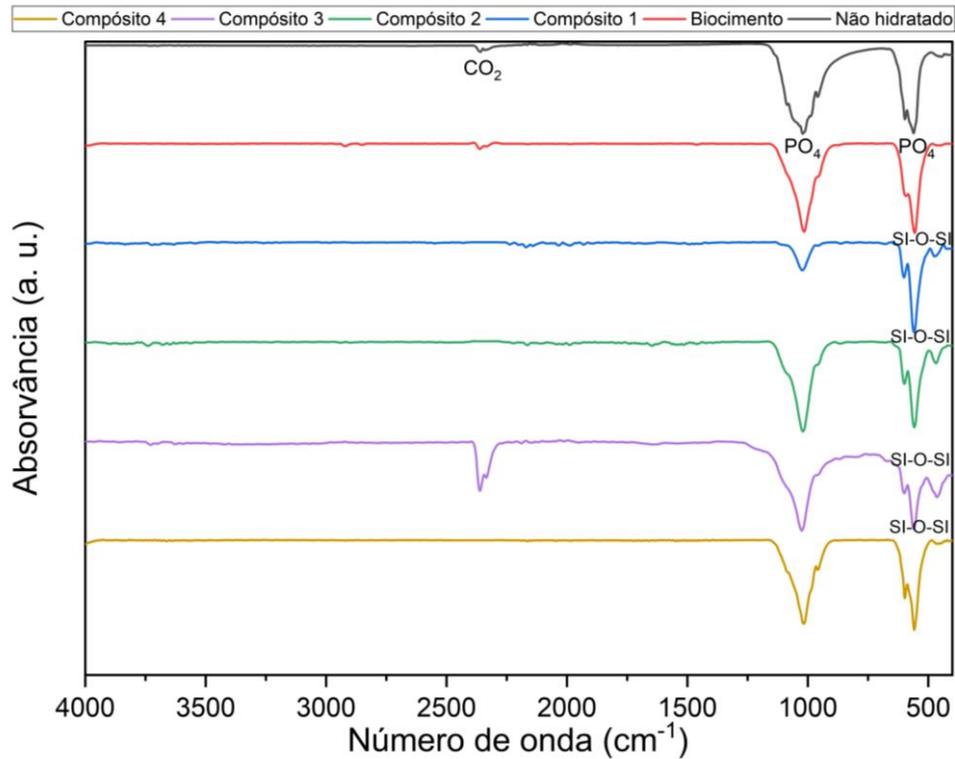


Figura 44 – Espectroscopia das cinco amostras de biocimento em 28 dias.



Fonte: Do autor, 2023.

Por meio das Figuras 42, 43 e 44 pode-se observar os resultados do espectrograma para cada um dos cinco compósitos de biocimento obtido. Nessas Figuras, pode-se observar que os mesmos picos de  $\text{PO}_4$  que estavam presentes na hidroxiapatita antes do tratamento térmico para obtenção do biocimento, estão presentes nos picos dos compósitos após o tratamento térmico e hidratação. Estes picos são observados nas bandas  $560 \text{ cm}^{-1}$  e  $1020 \text{ cm}^{-1}$ . Além destes, ocorre um pico a  $2400 \text{ cm}^{-1}$  característico da presença de  $\text{CO}_2$  e outras bandas de vibrações entre  $3500 \text{ cm}^{-1}$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$  demonstrando a presença de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Cabe destacar que para cada compósito foi observado que a intensidade dos picos foi alterada. Foi utilizado para fins de comparação o biocimento antes da fase de hidratação.

A Figura 42 mostra o espectrograma com relação ao período de 7 dias de todos os compósitos. Pode-se observar que o biocimento hidratado apresentou um aumento no pico de intensidade nas bandas referentes ao  $\text{PO}_4$  e ao  $\text{CO}_2$ , também foi possível evidenciar um pico de intensidade na banda de  $4000 \text{ cm}^{-1}$  referente a presença de  $\text{H}_2\text{O}$ . O compósito 1 apresentou um pico de intensidade semelhante ao

de  $\text{PO}_4$  do que o pó de biocimento hidratado, e apresentou também picos de intensidade que se referem a presença de  $\text{H}_2\text{O}$ , porém a intensidade de  $\text{CO}_2$  reduziu inclusive com relação ao compósito não hidratado. O compósito 2 apresentou um pico de intensidade para  $\text{PO}_4$  abaixo do compósito não hidratado, assim como o compósito 1, também apresentou uma redução na intensidade de  $\text{CO}_2$ , mais continuou evidenciando a presença de  $\text{H}_2\text{O}$ . O compósito 3 apresentou a intensidade relacionada aos picos de  $\text{PO}_4$  semelhantes a amostra não hidratada, porém como as demais amostras hidratadas apresenta picos relacionados a presença de  $\text{H}_2\text{O}$ . O compósito 4 apresentou intensidade para o  $\text{PO}_4$  semelhante ao da amostra não hidratada, como as demais amostras hidratadas apresentou picos de intensidade para  $\text{H}_2\text{O}$ , porém é o único dos compósitos que não apresentou picos de intensidade para o  $\text{CO}_2$ .

Além deste fato pode-se observar que os compósitos 1, 2, 3 e 4 apresentaram um pico a  $460\text{ cm}^{-1}$ , este, por sua vez, evidencia a presença de sílica por meio do grupo silanol SI-O-SI. Cabe salientar que quanto maior o percentual de sílica no compósito, maior é o pico sílica no material, conforme destacado no compósito 3, que possui 15% de nanopartículas de sílica em sua massa total.

A Figura 43 apresenta o espectrograma com relação ao período de 14 dias de todos os compósitos. Todos os compósitos hidratados apresentaram picos relacionados a presença de  $\text{H}_2\text{O}$ . O biocimento hidratado apresentou o mesmo comportamento observado no tempo de cura de 7 dias, ou seja, aumento nos picos de intensidades referentes a presença de  $\text{PO}_4$ . Este compósito identificou a presença de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  na mesma proporção de cura de 7 dias. A presença do grupo silanol SI-O-SI a  $460\text{ cm}^{-1}$ , também ficou evidenciado após 14 dias.

No compósito 1 os picos de intensidade do  $\text{PO}_4$  ficaram um pouco abaixo do biocimento não hidratado, mas continuaram evidenciando a presença de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . No compósito 2 o pico de intensidade do  $\text{PO}_4$  voltou a ficar acima do biocimento não hidratado, entretanto os picos de intensidade do  $\text{CO}_2$  e do  $\text{H}_2\text{O}$  também foram evidenciados assim como nos outros biocimento hidratados. O compósito 3 demonstrou comportamento semelhante aos compósitos 1 e 2 com presença de picos de  $\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CO}_2$ . O compósito 4 apresentou comportamento muito semelhante ao compósito 1, inclusive na intensidade de picos, provavelmente em razão da adição de apenas 1% de massa de nanopartículas de sílica mesoporosa na massa total. Cabe destacar que os compósitos 2 e 3, coincidentemente os compósitos com adição de 10

e 15% de nanopartículas de sílica na massa total de biocimento apresentaram um pico de intensidade em  $450\text{ cm}^{-1}$ .

A Figura 44, apresenta o espectrograma dos resultados com relação ao período de 28 dias de todos os compósitos. Todos os compósitos apresentaram um comportamento semelhante aos resultados de 7 e 14 dias. Porém, cabe destacar um pico maior de  $\text{CO}_2$  presente no compósito 3 após 28 dias. Este compósito é o que tem 15% de nanopartículas de sílica em sua massa total. Esse resultado evidencia o processo de carbonatação após 28 dias para esse compósito.

## 5.6 TESTES *IN VITRO*

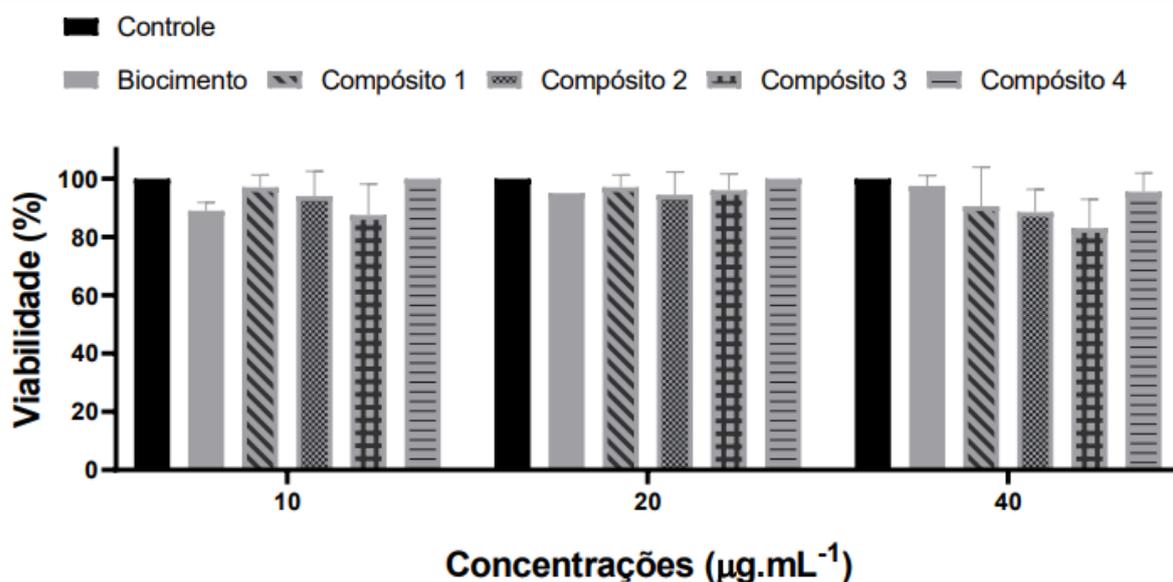
Com o intuito de verificar a viabilidade biológica dos biocimentos com adição de nanopartículas de sílica foram realizados ensaios *in vitro*.

### 5.6.1 VIABILIDADE CELULAR DOS COMPÓSITOS DE BIOCIMENTOS

A introdução de ensaios de citotoxicidade neste estudo desempenha um papel fundamental na avaliação abrangente dos biocimentos enriquecidos com sílica. Essa análise específica tem como objetivo avaliar os efeitos da presença de nanopartículas de sílica quando incorporadas nos biocimentos na viabilidade e integridade das células. Esses ensaios fornecem informações críticas sobre a segurança desses materiais em contextos biomédicos, destacando a importância de garantir que a presença da sílica não comprometa a biocompatibilidade dos biocimentos nem afete adversamente as células circundantes. Além disso, a avaliação da citotoxicidade é essencial para verificar se os biocimentos enriquecidos com sílica mantêm sua eficácia terapêutica e capacidade de servir como sistemas de entrega de medicamentos para o tratamento de condições como a osteoporose.

Com relação aos ensaios *in vitro*, a primeira análise realizada foi para verificar a citotoxicidade dos compósitos de biocimentos. As amostras de biocimentos ósseos (Figura 45) não apresentaram efeito citotóxico sob as células NIH3T3 em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 45 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* de diferentes concentrações (10, 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) dos cimentos ósseos. Diferenças significativas em relação ao grupo controle, são demonstradas por \*  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).



Fonte: Do autor, 2023.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade são consistentes com a literatura, uma vez que a síntese de cimentos ósseos que contêm a fase HPA se destacam devido à sua similaridade com os minerais ósseos, excelente biocompatibilidade e capacidade de formar ligações fortes com o tecido ósseo (DOROZHKIN, 2013). Além da presença de HPA, Teixeira (2019) enfatiza que a inclusão de sílica, como um material inerte ao interagir com fluidos corporais e quando presente em formulações de fosfato, melhora sua biocompatibilidade e bioatividade.

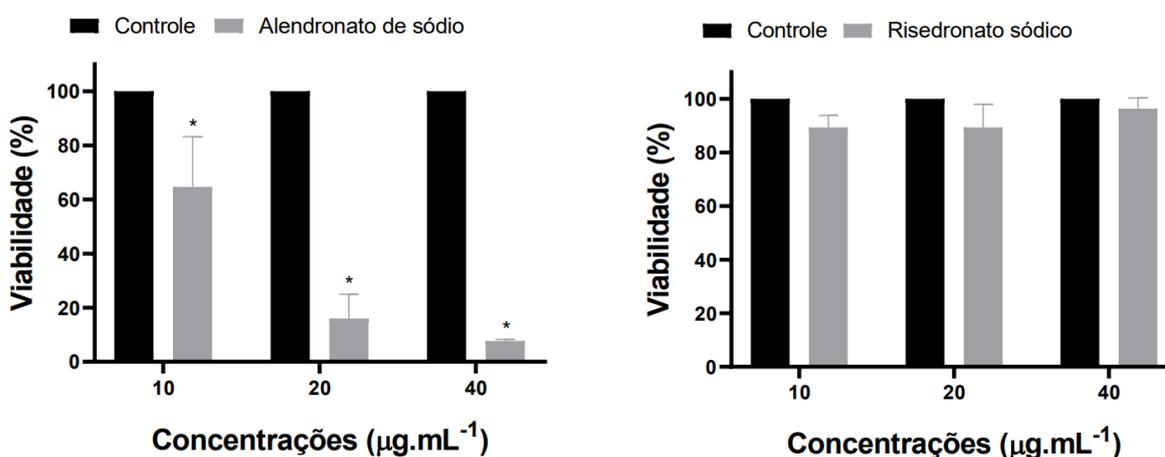
A avaliação da citotoxicidade se torna particularmente significativa ao considerar a incorporação de medicamentos como o alendronato sódico e o risedronato sódico em biocimentos enriquecidos com sílica, conforme delineado no objetivo geral do estudo. Os bisfosfonatos, incluindo o alendronato sódico e o risedronato sódico, constituem um componente crítico do tratamento da osteoporose. No entanto, esses medicamentos são conhecidos por seus potenciais efeitos colaterais adversos. Portanto, ao introduzir esses medicamentos nas matrizes de biocimento enriquecidas com nanopartículas de sílica, é fundamental avaliar sua citotoxicidade. Essa avaliação fornece informações essenciais sobre se a presença

da sílica e a combinação de medicamentos afetam a viabilidade e a saúde das células. Além disso, ajuda a verificar se o sistema inovador de entrega de medicamentos, conforme explorado neste estudo, mantém sua eficácia terapêutica enquanto minimiza qualquer dano potencial às células circundantes, em conformidade com os objetivos principais da pesquisa.

Após a análise da citotoxicidade dos compósitos de biocimento, ensaios de citotoxicidade foram realizados com os dois medicamentos individualmente para identificar qual dos dois medicamentos apresentava maior citotoxicidade. Nesse contexto, a Figura 46 mostra a viabilidade celular do alendronato sódico e do risedronato sódico. Com relação aos testes de viabilidade celular com o alendronato sódico (Figura 46(A)), todas as concentrações foram citotóxicas. Em contrapartida nos testes de viabilidade células com risedronato sódico (Figura 46(B)) nenhuma concentração foi citotóxica.

Os ensaios de citotoxicidade com os medicamentos demonstraram que o alendronato sódico é um fármaco muito mais citotóxico do que o risedronato sódico. Correia, Caldeira, Marques, (2006) realizaram ensaios de citotoxicidade com o alendronato sódico e evidenciaram resultados semelhantes em testes em *in vitro* com o medicamento.

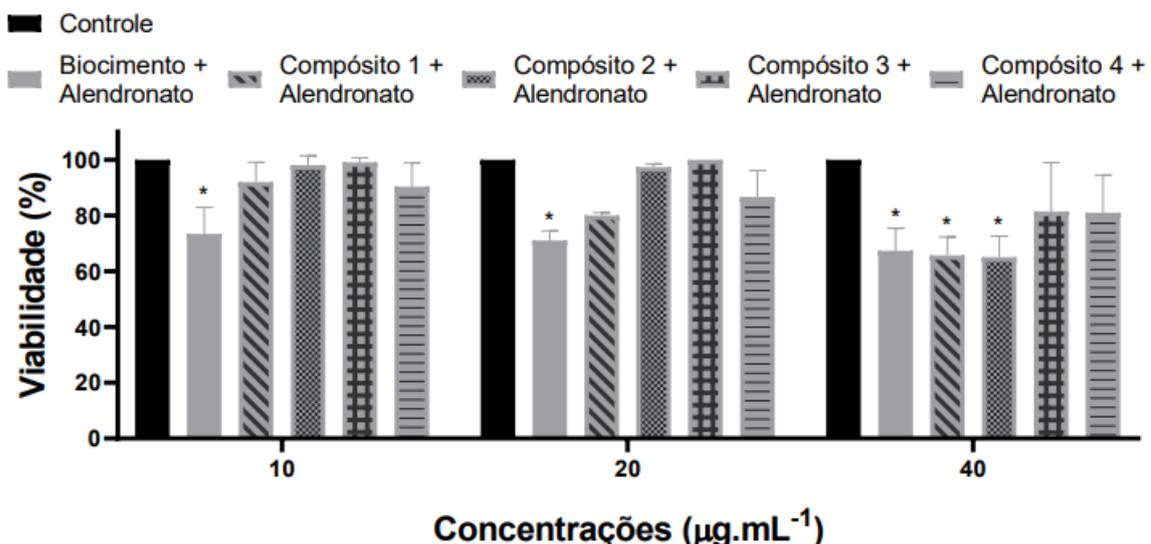
Figura 46 – Ensaio de citotoxicidade *in vitro* de diferentes concentrações (10, 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do Alendronato Sódico e risedronato de sódico. Diferenças significativas em relação ao grupo controle, são demonstradas por \*  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).



Fonte: Do autor, 2023.

Com os resultados individuais de citotoxicidade do pó de biocimento e dos medicamentos em mãos, o mesmo ensaio foi subseqüentemente conduzido para os compósitos de biocimento com a adição dos medicamentos. A Figura 47 ilustra o ensaio de citotoxicidade para o biocimento hidratado e os compósitos de biocimento, com a adição de alendronato de sódio. Nas amostras de cimentos com Alendronato (Figura 47), o biocimento + Alendronato apresentou citotoxicidade em todas as concentrações. O Compósito 1 + Alendronato exibiu citotoxicidade nas duas concentrações mais altas (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). O Compósito 2 + Alendronato mostrou citotoxicidade apenas na concentração mais alta (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), enquanto o Compósito 3 e o Compósito 4 + Alendronato não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados apresentados na Figura 47 indicam que a adição de nanopartículas de sílica provenientes da rota 2 em uma porcentagem de 1% em relação à massa total do cimento ósseo (Compósito 4) não exibe citotoxicidade. No entanto, para que o cimento ósseo com a adição de nanopartículas de sílica da rota 1 seja não citotóxico, é necessário adicionar pelo menos 15% do material à massa total do cimento ósseo. Os resultados evidenciaram que a adição de alendronato nos cimentos ósseos alterou sua citotoxicidade.

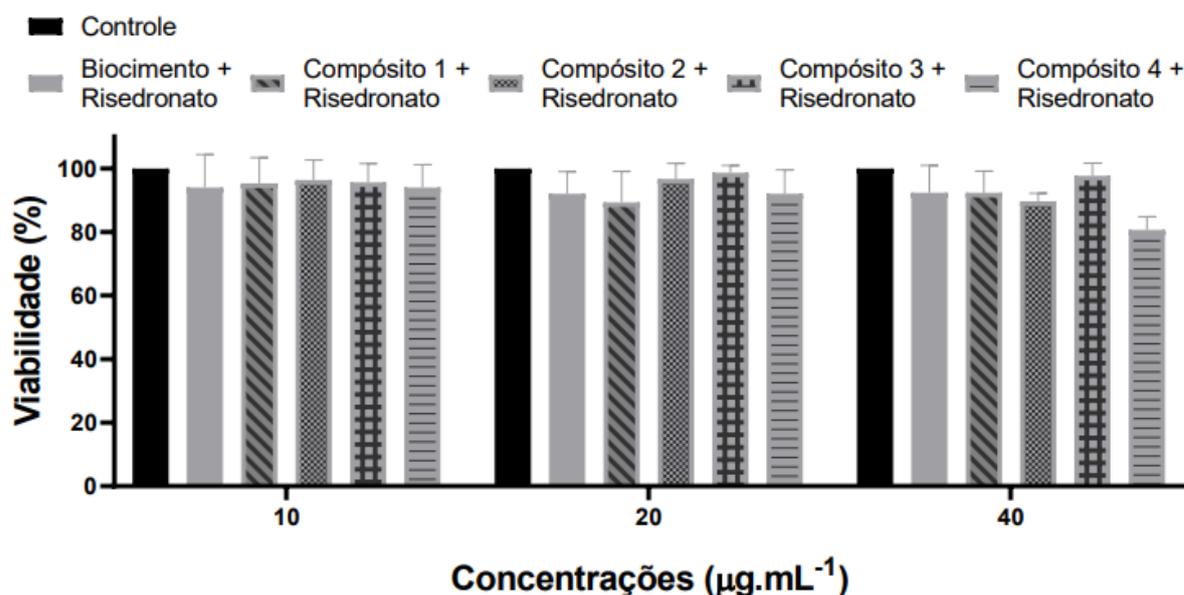
Figura 47 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* de diferentes concentrações (10, 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dos cimentos ósseos com Alendronato. Diferenças significativas em relação ao grupo controle, são demonstradas por \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,0005$  (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).



O alendronato exibe afinidade pela HPA; no entanto, suas moléculas de medicamento estão ligadas às superfícies minerais por meio de interações eletrostáticas, levando a uma capacidade de carga limitada e à possibilidade de liberação rápida após a administração. Esse fator muitas vezes pode ser abordado usando outros materiais na composição do sistema de liberação do medicamento (KLARA; LEWANDOWSKA-ŁAŃCUCKA, 2022).

Com relação as amostras de cimentos com Risedronato sódico (Figura 48), todos os compósitos não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 48 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* de diferentes concentrações (10, 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dos cimentos ósseos com Risedronato Sódico. Diferenças significativas em relação ao grupo controle, são demonstradas por \*  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).



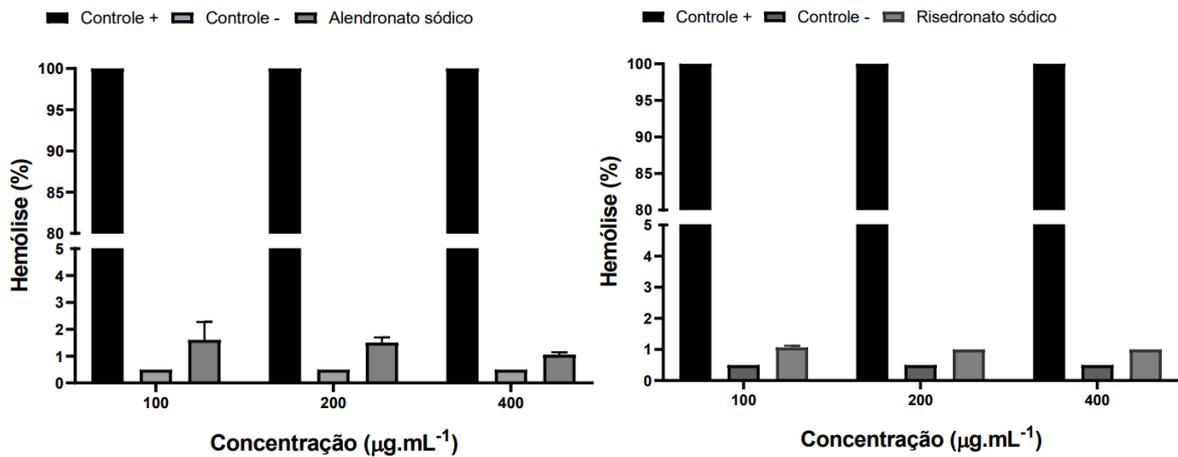
Fonte: Do autor, 2023.

### 5.6.2 HEMOCOMPATIBILIDADE DOS COMPÓSITOS DE BIOCIMENTO

Após os ensaios de citotoxicidade os medicamentos e os compósitos de biocimento foram encaminhados ao ensaio de hemocompatibilidade. No teste de hemocompatibilidade com os fármacos (Figura 49), nenhuma das amostras de

Alendronato Sódico e nem de Risedronato Sódico tiveram efeito hemolítico em nenhuma das concentrações testadas.

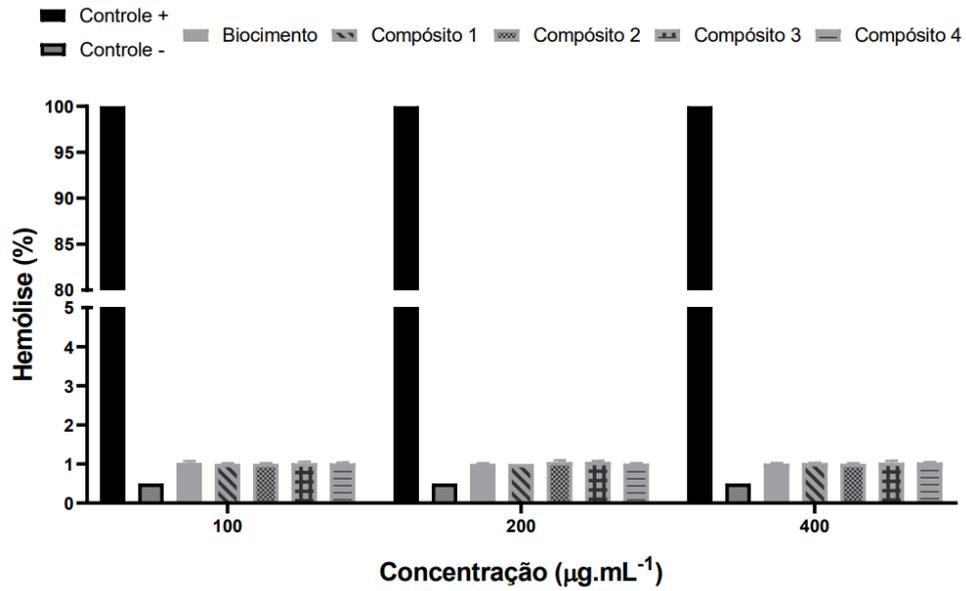
Figura 49 - Teste de Hemocompatibilidade do Alendronato Sódico e do Risedronato sódico em diferentes concentrações (100, 200 e 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (C). Diferenças significativas são mostradas  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).



Fonte: Do autor, 2023.

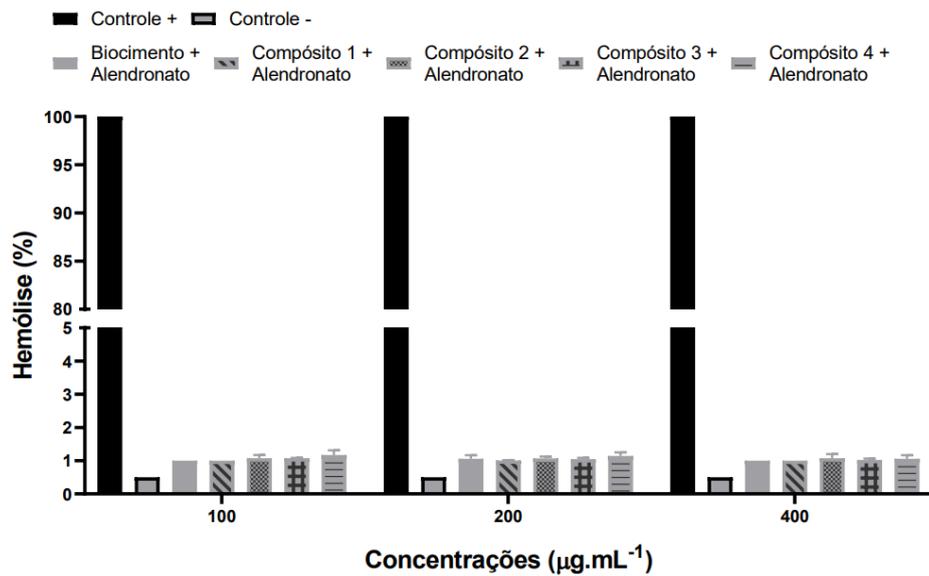
Assim como observado nos medicamentos, nenhuma das amostras de cimentos ósseos (Figura 50), nem de cimentos com alendronato sódico (Figura 51) e cimento com Risedronato Sódico (Figura 52) tiveram efeito hemolítico em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 50 - Teste de Hemocompatibilidade dos cimentos ósseos de diferentes concentrações (100, 200 e 400 µg/mL). Diferenças significativas são mostradas p < 0,05 quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).



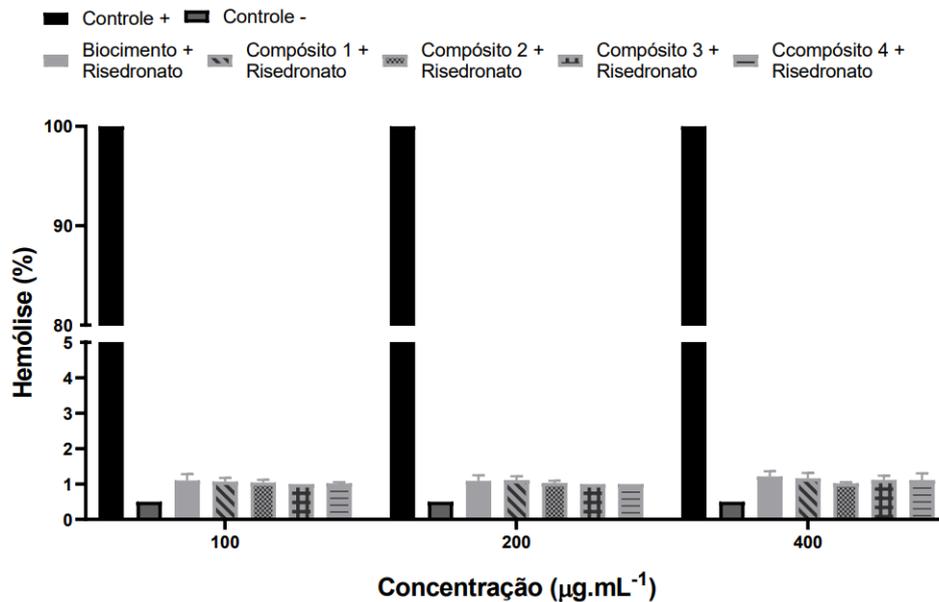
Fonte: Do autor, 2023.

Figura 51 - Teste de Hemocompatibilidade dos cimentos com Alendronato Sódico de diferentes concentrações (100, 200 e 400 µg/mL). Diferenças significativas são mostradas p < 0,05 quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).



Fonte: Do autor, 2023.

Figura 52 - Teste de Hemocompatibilidade dos cimentos com Risedronato Sódico de diferentes concentrações (100, 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$ ). Diferenças significativas são mostradas  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).



Fonte: Do autor, 2023.

Todos os ensaios de hemocompatibilidade, tanto os medicamento, como para os compósitos com biocimento a hemólise foi inferior a 2%, e valores menores que 5% de hemólise são consideradas seguras para o uso de biomateriais, de acordo com a ISO/TR 7406 (PRIYA *et al.*, 2020).

### 5.6.3 ENTREGA DE FÁRMACOS

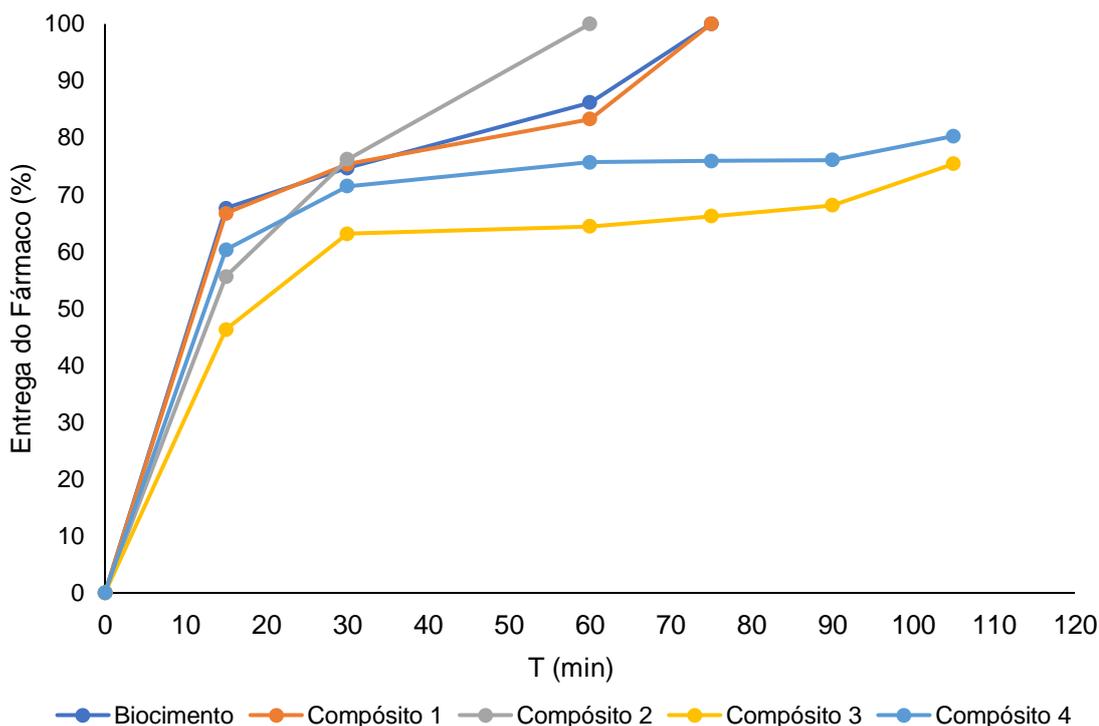
#### 5.6.3.1 Entrega com o Risedronato sódico

A escolha por esse medicamento em detrimento ao alendronato sódico, se deu pela razão do medicamento não se apresentar citotóxico nos ensaios de viabilidade celular.

Foram inseridos na massa total do biocimento e de cada um dos 4 compósitos de biocimento, 1% do medicamento risedronato sódico. Após a inserção do medicamento em cada um dos cinco compósitos de biocimento foi iniciado o ensaio

de entrega do fármaco. A Figura 53 apresenta os resultados obtidos da entrega do risedronato sódico para cada um dos cinco biocimentos.

Figura 53 – Ensaio de entrega do fármaco risedronato sódico por meio dos compósitos de biocimento estudados.



Fonte: Do autor, 2023.

Conforme pode-se observar na Figura 53, para liberação de 50% do fármaco risedronato sódico em todos os compósitos de biocimento, foram necessários menos de 14 min. Além disso, outro ponto a se destacar é referente ao tempo total de entrega do medicamento. Neste sentido o biocimento e o compósito 1 levaram 75 min para entrega total do fármaco, enquanto o compósito 2 levou 60 min. Em contrapartida, os compósitos 3 e 4, conseguiram realizar a entrega de 75% e 80% do medicamento respectivamente ao final de todo o período do ensaio, ou seja, 105 min.

A Figura 53 evidencia a entrega de 50% do risedronato sódico ao longo de no máximo 14 min. O biocimento precisou de 11 min e 9 s, o compósito 1, 11 min e 24 s. O compósito 2, 13 min e 49 s. O compósito 3, 12 min e 46 s e o compósito 4, 12 mi e 44 s.

A liberação de 50% do risedronato sódico nos primeiros minutos é considerado importante para o tratamento, o que ocorreu com todos os compósitos desenvolvidos. Porém a entrega total do medicamento precisa de um tempo maior de liberação, o que ocorreu nos compósitos 3 e 4, que ao final do ensaio ainda não haviam liberado todo o medicamento, o que caracteriza uma entrega controlada.

Nos compósitos 1 e 2 que possuíam respectivamente em sua massa total 5 e 10% de adição de nanopartículas de sílica, esse percentual não foi o suficiente para a liberação controlada do medicamento, pois a entrega total do medicamento ocorreu em 75 min. Esse resultado evidenciou que seria necessária uma maior concentração de nanopartículas de sílica na massa total ou uma maior área superficial no compósito sintetizado, o que fica evidenciado nos compósitos 3 e 4.

A liberação controlada do compósito 3, que possui o maior percentual de nanopartículas de sílica, 15% em sua massa total, pode ser explicado pela bioatividade da sílica. No entanto no compósito 4, que apresenta o menor percentual de nanopartículas de sílica apresentando, 1% em sua massa total, a liberação controlada se deve à presença das nanopartículas de sílica obtidas pela rota 2, que apresentaram neste estudo a maior área superficial de todos os compósitos. Essa maior área superficial permite a incorporação de uma quantidade maior de medicamento nestes compósitos possibilitando esta entrega controlada. Pelo fato deste compósito apresentar também uma maior resistência mecânica frente ao compósito 4, este compósito dentre todos os sintetizados foi o que apresentou o melhor resultado para entrega do risedronato sódico.

O tempo de liberação abrupto do risedronato sódico pode ser atribuído à alta solubilidade em água desse fármaco. Elnaggar *et al.* (2019) e El-Wakil *et al.* (2022), apresentaram resultados que corroboram com o tempo de liberação do fármaco obtido nesta pesquisa. Em seus ensaios, o resultado da liberação total do fármaco ocorreu em 1 h, enquanto a liberação de 50% do fármaco em todos os seus experimentos ocorreu antes de 20 min.

## 6 CONCLUSÕES

Os parâmetros utilizados para a síntese dos compostos de cimento ósseo mostraram-se adequados para a obtenção do cimento ósseo, como evidenciado pelos resultados obtidos a partir da análise química, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), calorimetria e ensaios mecânicos.

As análises revelaram um material nanométrico com a morfologia característica do cimento ósseo. Após a hidratação e a cura do cimento ósseo em temperatura ambiente, foi observado que o material manteve as fases presentes no pó do cimento ósseo, indicando que a hidratação não alterou as fases do cimento ósseo. No entanto, quando o mesmo cimento ósseo hidratado foi submetido à cura úmida, apenas a presença da fase HPA foi observada, confirmando que a umidade e a temperatura durante o processo de cura influenciam as fases do cimento ósseo. Um comportamento semelhante foi observado na resistência à compressão do cimento ósseo. O cimento ósseo com cura úmida exibiu resistência mecânica de 3 a 5 vezes maior do que o cimento ósseo curado em temperatura ambiente para os compostos 1, 2 e 5, que apresentaram respectivamente 1, 0,34 e 0,71 MPa. Esse aspecto revelou que, para esse tipo de cura, quanto maior a adição de nanopartículas de sílica, menor a resistência mecânica, fato corroborado pelo ensaio de calorimetria, onde os compósitos 3 e 4 que contêm 10 e 15% de adição de nanopartículas de sílica apresentaram redução no fluxo de calor se comparados aos compósitos 1, 2 e 5.

Testes *in vitro* demonstraram que os compostos de cimento ósseo não exibiram citotoxicidade. Além disso, os compostos que tiveram a adição de nanopartículas de sílica em sua composição interagiram com o cimento ósseo e o alendronato sódico, diminuindo ou até excluindo a citotoxicidade do medicamento quando incorporado ao cimento ósseo. O Compósito 5 obtido na rota 2 exibiu os melhores resultados, provavelmente devido à alta área superficial obtida. Quando os compostos receberam a adição de risedronato sódico, eles também não mostraram citotoxicidade, devido à natureza menos tóxica desse medicamento, como evidenciado no ensaio individual. Esses resultados sugerem que a adição de nanopartículas de sílica ao cimento ósseo oferece uma alternativa para a liberação de medicamentos na regeneração óssea, melhorando sua bioatividade.

Os ensaios de entrega do fármaco risedronato sódico evidenciaram a entrega total do medicamento nos primeiros 70 min para o biocimento e para os compósitos 1 e 2. Os compósitos 3 e 4 realizaram a entrega de 80% deste fármaco neste período, demonstrando que estes dois compósitos colaboraram para a entrega controlada do medicamento. O compósito 4, por ser constituído de 1% de nanopartículas de sílica com alta área superficial, obtido pela rota de síntese 2, o que foi determinante para a entrega.

Com base nesta pesquisa, estudos adicionais podem ser conduzidos como: investigar a incorporação de maiores percentagens das nanopartículas de sílica obtidas por meio da rota 2 em cimentos ósseos; ensaio de liberação do medicamento alendronato sódico por meio dos compósitos 3 e 4; e estudos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ALMQVIST, N.; Thonson, N.H.; Smith, B.L. Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials. **Materials Science & Engineering**. v. 7; p. 34-43, 1999.
- ABDALLA, J. A. *et al.* Influence of synthesized nanomaterials in the strength and durability of cementitious composites. **Case Studies in Construction Materials**, v. 18, p. e02197, 1 jul. 2023.
- AJAXON, I. *et al.* Elastic properties and strain-to-crack-initiation of calcium phosphate bone cements: Revelations of a high-resolution measurement technique. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 74, p. 428–437, 1 out. 2017.
- ALMEIDA, T. DE F. **Síntese e caracterização de biocimento de fosfato de cálcio usando resíduo de mármore**. Tese—Campos dos Goytacazes - RJ: Universidade Estadual do Norte e Fluminense - UENF, 2018.
- A.M. IBRAHIM, I.; ZIKRY, A. A. F.; A. SHARAF, M. Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica. **Journal of American Science**, v. 6, n. 11, p. 985–989, 2010.
- AMORIM, M. O. DE *et al.* Synthesis and characterization of natural hydroxyapatite extracted from pirarucu scales (*Arapaima gigas*). **Revista Materia**, v. 25, n. 1, 2020.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191–198, 2006.
- ANDRADE, Â. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas bioativas: estado da arte. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 100–104, fev. 2006.
- ARAÚJO, F. R. **Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato na regeneração de defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos com osteoporose induzida**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2018.
- ARCARO, S.; VENTURINI, J. **Modern Ferrites in Engineering**. [s.l.] Springer International Publishing, 2021.
- ARKIN, V. H. R. *et al.* Characterization and in Vitro Evaluations of Injectable Calcium Phosphate Cement Doped with Magnesium and Strontium. **ACS Omega**, v. 6, n. 4, p. 2477–2486, 2021.
- BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. **Characterization of biomaterials**. Massachusetts: Elsevier, 2013.

- BAPAT, R. A. *et al.* An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. **Materials Science and Engineering: C**, v. 91, p. 881–898, out. 2018.
- BARBHUIYA, G. H. *et al.* Effects of the nanosilica addition on cement concrete: A review. **Materials Today: Proceedings**, v. 32, p. 560–566, 1 jan. 2020.
- BARRA, R. **Fratura óssea: o que é, tipos, sintomas e cuidados | IMEB**. Disponível em: <<https://imeb.com.br/fratura-ossea/>>. Acesso em: 6 jul. 2021.
- BERZINA-CIMDINA, L. *et al.* **Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. [s.l.] IntechOpen, 2012.
- BITAR, A. *et al.* Silica-based nanoparticles for biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19–20, p. 1147–1154, 2012.
- BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**, v. 31, n. SUPPL. 4, p. D37–D47, 1 dez. 2000.
- BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1759, 2009.
- BONAN, R. F. *et al.* Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita. **Cerâmica**, v. 60, n. 355, p. 402–410, set. 2014.
- BOROUJENI, N. M. *et al.* Development of monetite/phosphorylated chitosan composite bone cement. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 2, p. 260–266, 1 fev. 2014.
- BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 546, out. 2012.
- BOSKEY, A. L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. **BoneKEy Reports**, v. 2, p. 447, 4 dez. 2013.
- BOUREBRAB, M. A. *et al.* Influence of the initial chemical conditions on the rational design of silica particles. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 88, p. 430–441, 2018.
- BROVARONE, C. V.; VERNÉ, E.; APPENDINO, P. Macroporous bioactive glass-ceramic scaffolds for tissue engineering. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 17, n. 11, p. 1069–78, 22 nov. 2006.
- CABRAL, C. S. M. **Nanopartículas híbridadas para sistemas de drug delivery inteligentes**. Mestrado—Porto: Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, 2015.

- CAI, Q.-Y. *et al.* A rapid fluorescence “switch-on” assay for glutathione detection by using carbon dots-MnO<sub>2</sub> nanocomposites. **Biosensors & bioelectronics**, v. 72, p. 31–36, mar. 2015.
- CAMARGO, N. H. A. *et al.* Elaboration of a triphasic calcium phosphate and silica nanocomposite for maxillary grafting and deposition on titanium implants. **International Journal of Materials Research**, 2018.
- CAMARGO, N. H. A.; SOARES, C.; GEMELLI, E. Elaboration and characterization of nanostructured bioceramics for biomedical applications. **Materials Research**, v. 10, n. 2, p. 135–140, 2007.
- CAO, L. *et al.* Poly(N-isopropylacrylamide) and poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) grafted on an ordered mesoporous silica surface using atom transfer radical polymerization with activators regenerated by electron transfer. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 14, p. 6939–6946, 13 mar. 2012.
- CAO, L.; KRUK, M. Short synthesis of ordered silicas with very large mesopores. **RSC Advances**, v. 4, n. 1, p. 331–339, jan. 2013.
- CARDOSO, H. A. I.; MOTISUKE, M.; ZAVAGLIA, C. A. C. The Influence of Three Additives on the Setting Reaction Kinetics and Mechanical Strength Evolution of [Alpha]-Tricalcium Phosphate Cements. **Key Engineering Materials**, v. 493–494, p. 397–402, 2012.
- CHAPA-GONZÁLEZ, C.; PIÑÓN-URBINA, A. L.; GARCÍA-CASILLAS, P. E. Synthesis of controlled-size silica nanoparticles from sodium metasilicate and the effect of the addition of PEG in the size distribution. **Materials**, v. 11, n. 4, mar. 2018.
- CHEN, Q.; THOUAS, G. A. **Metallic implant biomaterials. Materials Science and Engineering R: Reports** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2015. . Acesso em: 31 maio. 2021
- CORREIA, V. D. F. P.; CALDEIRA, C. L.; MARQUES, M. M. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. **Dental Traumatology**, v. 22, n. 6, p. 312–317, 1 dez. 2006.
- COSTA, A. C. F. M. *et al.* **Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações.** 2009.
- COUTINHO, E. C. Nanopartículas híbridas de sílica mesoporosas. **Tecnico Lisboa**, p. 3–4, 2014.
- COVERED, T.; MATERIALS, I. Biomaterials - Classifications and Behaviour of Different Types of Biomaterials. p. 3–5, 2000.

DA SILVA FERNANDES, R. **Desenvolvimento de nanossensores fluorescentes reutilizáveis baseados em sílica de Stöber**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 18 fev. 2014.

DA SILVA, N. M. P.; ESPITALIER, F.; NZIHOU, A. Precipitation Process of Calcium Phosphate from Calcium Carbonate Suspension. **KONA Powder and Particle Journal**, v. 33, n. 33, p. 219–227, 2016.

DALMÔNICO, G. M. L. *et al.* Elaboration biphasic calcium phosphate nanostructured powders. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 54, n. 1, p. 37–43, 1 jan. 2015.

DANTAS, T. S. *et al.* Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia Bone Graft Materials and their Application in Dentistry. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 131–136, 2011.

DE GROOTL, K.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. Calcium phosphate coatings for medical implants. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 212, n. 2, p. 137–147, 5 ago. 1998.

DIEZ-ESCUADERO, A.; ESPANOL, M.; GINEBRA, M. P. Synthetic bone graft substitutes: Calcium-based biomaterials. **Dental Implants and Bone Grafts: Materials and Biological Issues**, p. 125–157, 1 jan. 2020.

DING, G.-J. *et al.* Porous microspheres of amorphous calcium phosphate: block copolymer templated microwave-assisted hydrothermal synthesis and application in drug delivery. **Journal of colloid and interface science**, v. 443, p. 72–79, mar. 2015.

DOADRIO, A. L. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as a new carrier methodology in the controlled release of the active components in a polypill. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 1–8, mar. 2017.

DOBROVOL'SKAYA, I. P. *et al.* Effect of Thermal Treatment on the Structure and Properties of Hydroxyapatite. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 368–374, 1 mar. 2018.

DOROZHKIN, S. V. Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. **Materials**, v. 6, p. 3840–3942, 2013.

DOS SANTOS, E. A.; PINTO, V. B. BARREIRA. Materiais cerâmicos. Em: GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. D. A. (Eds.). **Biomateriais em Odontologia: princípios, métodos investigativos e aplicações**. São Paulo: VM Cultural Editora Ltda., 2011.

- DOS SANTOS, L. A. *et al.* Alpha-tricalcium phosphate cement: “in vitro” cytotoxicity. **Biomaterials**, v. 23, p. 2035–2042, 2002.
- DROUET, C. Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- EILBAGI, M. *et al.* Mechanical and cytotoxicity evaluation of nanostructured hydroxyapatite-bredigite scaffolds for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 603–612, 1 nov. 2016.
- ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. **Materials**, v. 10, n. 4, 24 mar. 2017.
- ELNAGGAR, Y. S. R. *et al.* Anionic versus cationic bilosomes as oral nanocarriers for enhanced delivery of the hydrophilic drug risedronate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 564, p. 410–425, 10 jun. 2019.
- EL-WAKIL, N. *et al.* Risedronate-loaded aerogel scaffolds for bone regeneration. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2152135>, v. 30, n. 1, p. 51–63, 2022.
- ESCOTO-VIVERO, J. **Silica Nanoparticles: Preparation, Properties and Uses**. New York: Nova Science Publisher, 2012.
- EZZEDDINE, Z. *et al.* Divalent heavy metals adsorption onto different types of EDTA-modified mesoporous materials: Effectiveness and complexation rate. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 212, p. 125–136, 1 ago. 2015.
- FECHINE, P. B. A. (ORG. ). **Avanços no desenvolvimento de nanomateriais**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020.
- FERNANDES, F. R. D. ; *et al.* Síntese e Caracterização do Material Mesoporoso SBA-15 Obtido com Diferentes Condições de Síntese Synthesis and Characterization of Mesoporous Materials SBA-15 Obtained with Different Synthesis Conditions. **Rev. Virtual Quim**, v. 8, n. 6, p. 1855–1864, 2016.
- FERNANDES, R. DA S. **Desenvolvimento de nanossensores fluorescentes reutilizáveis baseados em sílica de Stöber**. , mar. 2014. Disponível em: <[http://acervus.unicamp.br/index.asp?codigo\\_sophia=931864](http://acervus.unicamp.br/index.asp?codigo_sophia=931864)>
- FERNANDES, R. G. ; F. L. H. ; C. Y. R. *et al.* Estudo da Reparação Óssea na Mandíbula de Coelhos Sob a Ação do Alendronato Sódico e da sua Associação com a Hidroxiapatita. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 33, n. 3, p. 123–130, 4 jun. 2013.

- FERNANDES, R. G.; FAIG-LEITE, H.; CARVALHO, Y. R. Estudo da Reparação Óssea na Mandíbula de Coelhos Sob a Ação do Alendronato Sódico e da sua Associação com a Hidroxiapatita. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 33, n. 3, p. 123–153, 2004.
- FONSECA, L. C. *et al.* Nanocomposites based on graphene oxide and mesoporous silica nanoparticles: Preparation, characterization and nanobiointeractions with red blood cells and human plasma proteins. **Applied Surface Science**, v. 437, p. 110–121, 15 abr. 2018.
- FRANCZAK, P. F. *et al.* Hydration study from different calcium phosphate biocements with microstructure and nanostructure. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 105, n. 4, p. 820–827, 1 maio 2017.
- FU, Q. *et al.* In Vitro Study on Different Cell Response to Spherical Hydroxyapatite Nanoparticles. **OF BIOMATERIALS APPLICATIONS**, v. 23, 2008.
- GARBUZ, D. S. *et al.* Enhanced Gap Filling and Osteoconduction Associated with Alendronate-Calcium Phosphate-Coated Porous Tantalum. **The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume**, v. 90, n. 5, p. 1090–1100, fev. 2008.
- GARCIA, A.; SPIM, J. A.; SANTOS C. A. Ensaio de dureza. Em: **Ensaio de materiais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.
- GARTNER, L. P. **Atlas colorido de histologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- GASIK, M. Understanding biomaterial-tissue interface quality: combined *in vitro* evaluation. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 18, n. 1, p. 550–562, 2017.
- GINEBRA, M. P. *et al.* Calcium phosphate cements as drug delivery materials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 12, p. 1090–1110, 1 set. 2012.
- GOMES, L. C. *et al.* Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. **Cerâmica**, v. 58, n. 348, p. 448–452, mar. 2012.
- GOMES, L. S. ; FURTADO, A. C. R. ;; SOUZA, M. C. A Sílica e suas Particularidades Silica and its Peculiarities. **Rev. Virtual Quim**, v. 10, n. 4, 2018.
- GONG, T. *et al.* Osteogenic and anti-osteoporotic effects of risedronate-added calcium phosphate silicate cement. **Biomedical Materials**, v. 11, n. 4, p. 045002, 7 jul. 2016.
- GUARNIERO, R.; OLIVEIRA, L. G. Osteoporose: atualização no diagnóstico e princípios básicos para o tratamento Osteoporosis: an update in diagnosis and basic treatment principles. **Revista brasileira de ortopedia**, v. 39, n. 11, p. 477–485, 2004.

- GUO, Q. *et al.* Synthesis and characterization of spherical silica nanoparticles by modified Stöber process assisted by slow-hydrolysis catalyst. **Colloid and Polymer Science**, v. 296, n. 2, p. 379–384, 9 fev. 2018.
- HANSEL, D. E. **Fundamentos de rubin patologia**. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- HE, D. *et al.* Effect of hydrothermal treatment temperature on the hydroxyapatite coatings deposited by electrochemical method. **Surface and Coatings Technology**, v. 406, p. 126656, 25 jan. 2021.
- HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. **Materials Selection** Marcel Dekker Inc, , 1995. (Nota técnica).
- HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487–1510, 1 jul. 1991.
- HUANG, X. H.; CHANG, J. Preparation of nanocrystalline bredigite powders with apatite-forming ability by a simple combustion method. **Materials Research Bulletin**, v. 43, n. 6, p. 1615–1620, 3 jun. 2008.
- JAMBHRUNKAR, S. *et al.* Modulating in vitro release and solubility of griseofulvin using functionalized mesoporous silica nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 434, 2014.
- JAMMALAMADAKA, U.; TAPPA, K. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, p. 22, 1 mar. 2018.
- JUHÁSZ, M. *et al.* Thermal stability of vitamin C: Thermogravimetric analysis and use of total ion monitoring chromatograms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, n. 1, p. 190–193, mar. 2012.
- JUNQUEIRA, L. C. **Histologia Básica Texto & Atlas**. 16. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- KARVAT, F. *et al.* Elaboração e Caracterização de um Biomaterial Compósito a partir de uma Matriz Fosfato de Cálcio/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-α. para Aplicação Como Implante e Restituição Óssea. **Revista Matéria**, n. 10, p. 43–50, 2005.
- KHAN, A. F. *et al.* **Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration**. **Materials Science and Engineering** CElsevier Ltd, , mar. 2014.

- KIM, D. W.; AN, J. S.; CHO, I. S. Effects of Mg and Sr co-addition on the densification and biocompatible properties of calcium pyrophosphate. **Ceramics International**, v. 44, n. 8, p. 9689–9695, 1 jun. 2018.
- KLARA, J.; LEWANDOWSKA-ŁAŃCUCKA, J. How Efficient are Alendronate-Nano/Biomaterial Combinations for Anti-Osteoporosis Therapy? An Evidence-Based Review of the Literature. **International journal of nanomedicine**, v. 17, p. 6065–6094, 2022.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 1 maio 2006.
- KUMTA, P. N. *et al.* Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: Novel synthesis and characterization. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 1, p. 65–83, 1 jan. 2005.
- LANDI, E. *et al.* Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 19, n. 1, p. 239–247, jan. 2008.
- LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 11, p. 4742–4753, nov. 2008.
- LEVANDOWSKI JUNIOR, NELSON. **Análise comparativa de diferentes substitutos ósseos sintéticos microporosos em calvária de coelhos**. Tese (Doutorado)—Joinville: Universidade do Estado de Santa Catarina, 2014.
- LIAO, S. S. *et al.* Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: nano-HA/collagen/PLA composite. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 69, n. 2, p. 158–165, 15 maio 2004.
- LINK, D. P. *et al.* Mechanical evaluation of implanted calcium phosphate cement incorporated with PLGA microparticles. **Biomaterials**, v. 27, p. 4941–4947, 2006.
- LONG, M.; RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement - A materials science perspective. **Biomaterials**, v. 19, n. 18, p. 1621–1639, set. 1998.
- LOPES, M. F. V. S. **Biocompatibilidade de dispositivos médicos**. Dissertação de Mestrado—Lisboa: Universidade de Lisboa, 23 out. 2017.
- LOPEZ-HEREDIA, M. A. *et al.* An injectable calcium phosphate cement for the local delivery of paclitaxel to bone. **Biomaterials**, v. 32, n. 23, p. 5411–5416, ago. 2011.
- LOURENÇO, E. R. A. **Produção e caracterização de biocimentos de apatitas nanométricas incorporados com dióxido de silício para aplicações biomédicas**. Tese—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, mar. 2016.

- LOURO, H.; BORGES, T.; SILVA, M. J. **Manufactured nanomaterials: New challenges for public health**. *Revista Portuguesa de Saude Publica* Ediciones Doyma, S.L., , 1 jul. 2013. . Acesso em: 12 abr. 2021
- MACHADO, J. L. M. **Desenvolvimento de cimento ósseo de fosfato de cálcio como para o crescimento de tecido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia)—Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- MADUREIRA, M. A. B. *et al.* Análise das propriedades mecânicas e biológicas do cimento ósseo de fosfato de cálcio bifásico nanoestruturado de cura rápida. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 25, n. 4, p. e-12859, 11 dez. 2020.
- MAITY, A.; POLSHETTIWAR, V. Dendritic Fibrous Nanosilica for Catalysis, Energy Harvesting, Carbon Dioxide Mitigation, Drug Delivery, and Sensing. **ChemSusChem**, v. 10, n. 20, p. 3866–3913, jan. 2017.
- MALIK, M. A.; WANI, M. Y.; HASHIM, M. A. Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials: 1st Nano Update. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 397–417, fev. 2012.
- MAMAEVA, V.; SAHLGREN, C.; LINDÉN, M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 5, p. 689–702, maio 2013.
- MANJUBALA, I.; SIVAKUMAR, M. In-situ synthesis of biphasic calcium phosphate ceramics using microwave irradiation. **Materials Chemistry and Physics**, v. 71, p. 272–278, 2001.
- MARQUES, C. F. *et al.* Insights on the properties of levofloxacin-adsorbed Sr- and Mg-doped calcium phosphate powders. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1–12, 1 jul. 2016.
- MEDRADO, L. **Citologia e histologia humana fundamentos de morfofisiologia celular e tecidual**. São Paulo: Erica, 2014.
- MEDVECKY, L. *et al.* Tetracalcium Phosphate/Monetite/Calcium Sulfate Hemihdrate Biocement Powder Mixtures Prepared by the One-Step Synthesis for Preparation of Nanocrystalline Hydroxyapatite Biocement-Properties and In Vitro Evaluation. **Materials**, v. 14, n. 9, 1 maio 2021.
- MENDES FILHO, A. A. **Síntese e Caracterização de Hidroxiapatita e Compósitos a Partir de Matéria - Prima Reciclada Engenharia de Materiais, Universidade**. Doutorado—Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto, 2006.

- MOHAMMADI, H. *et al.* Bioinorganics in Bioactive Calcium Silicate Ceramics for Bone Tissue Repair: Bioactivity and Biological Properties. 2014.
- MOREJÓN-ALONSO, L.; CARRODEGUAS, R. G.; DOS SANTOS, L. A. Effects of silica addition on the chemical, mechanical and biological properties of a new  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate/Tricalcium Silicate Cement. **Materials Research-ibero-american Journal of Materials**, v. 14, n. 4, p. 475–482, out. 2011.
- MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, n. 15–16, p. 2385–2406, 1 dez. 2005.
- NEAMTU, J. *et al.* Hydroxyapatite–alendronate composite systems for biocompatible materials. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1567–1582, 27 fev. 2017.
- NOZAWA, K. *et al.* Smart Control of Monodisperse Sto 1 ber Silica Particles: Effect of Reactant Addition Rate on Growth Process. 2005.
- OLIVEIRA, I. R.; PANDOLFELLI, V. C.; JACOBOVITZ, M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. **International endodontic journal**, v. 43, n. 12, p. 1069–1076, dez. 2010.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais. Fundamentos e Aplicação**. [s.l: s.n.].
- OTSUKA, M. *et al.* A novel skeletal drug delivery system using self-setting bioactive glass bone cement. III: the in vitro drug release from bone cement containing indomethacin and its physicochemical properties. **Journal of Controlled Release**, v. 31, n. 2, p. 111–119, 1 set. 1994.
- ÖZER, T. *et al.* Effects of local alendronate administration on bone defect healing. Histomorphometric and radiological evaluation in a rabbit model 1. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 781–795, fev. 2017.
- PAHLEVANZADEH, F. *et al.* Development of PMMA-Mon-CNT bone cement with superior mechanical properties and favorable biological properties for use in bone-defect treatment. **Materials Letters**, v. 240, p. 9–12, 1 abr. 2019.
- PARENT, M. *et al.* Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 252, p. 1–17, 28 abr. 2017.

- PARK, K. **Controlled drug delivery systems: Past forward and future back.** **Journal of Controlled Release** Elsevier B.V., , 28 set. 2014.
- PEPPAS, N.A.; HUANG, Y.; TORRES-LUGO, M.; WARD, J.H.; ZHANG, J. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. Em: **Encyclopedia of Materials: Science and Technology.** [s.l.] Elsevier, 2000. p. 3492–3495.
- PETIT, C. *et al.* **In Situ Synthesis of Silver Nanocluster in AOT Reverse Micelles.** **J. Phys. Chem.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.
- PIAI, C. R. *et al.* Efeitos do risedronato na reparação óssea de ratos machos e fêmeas com osteopenia. **Brazilian Dental Science**, v. 8, n. 3, p. 77–82, 16 ago. 2005.
- PIMENTA, M. A. A.; MELO, C. P. Ciência e Natura. **Ciência e Natura**, p. 9–20, 3 set. 2007.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 1 ago. 2015.
- PRIYA, P. *et al.* Curcumin-loaded layer-by-layer folic acid and casein coated carboxymethyl cellulose/casein nanogels for treatment of skin cancer. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 694–708, 1 jan. 2020.
- PURA, J. A.; BOBYN, D. J.; TANZER, M. Implant-delivered Alendronate Causes a Dose-dependent Response on Net Bone Formation Around Porous Titanium Implants in Canines. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 474, n. 5, p. 1224–1233, fev. 2016.
- RABIEE, S. M. Development of hydroxyapatite bone cement for controlled drug release via tetracycline hydrochloride. **Bulletin of Materials Science**, v. 36, n. 1, p. 171–174, 2013.
- RAJABI, A. H. *et al.* Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite powder via sol-gel method. **IFMBE Proceedings**, v. 15, p. 149–151, 2007.
- RATNER, B. D. *et al.* Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition**, p. 1–1555, 1 jan. 2013.
- RICHTER, R. F. *et al.* Treatment of critical bone defects using calcium phosphate cement and mesoporous bioactive glass providing spatiotemporal drug delivery. **Bioactive Materials**, v. 28, p. 402–419, 1 out. 2023.

- ROCHA, S. M. W. **Análise do Reparo ósseo com alendronato de sódio associado ao osso bovino liofilizado (Bio-Oss) - Estudo radiomicrográfico em calvária de coelhos.** João Pessoa: [s.n.].
- ROLLER, B. L.; STOKER, A. M.; COOK, J. L. Elution properties of a resorbable magnesium phosphate cement. **Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma**, v. 11, p. S729–S734, 2020.
- ROOZBAHANI, M. *et al.* Nano-calcium phosphate bone cement based on Si-stabilized  $\alpha$ -tricalcium phosphate with improved mechanical properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 81, n. June, p. 532–541, 2017.
- ROOZBAHANI, M.; KHARAZIHA, M. Dexamethasone loaded Laponite®/porous calcium phosphate cement for treatment of bone defects. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 14, n. 5, 2019.
- ROSS, M. **Atlas de histologia descritiva.** Porto Alegre: ArtMed, 2015.
- SADEGHZADE, S. *et al.* Recent advances on bioactive baghdadite ceramic for bone tissue engineering applications: 20 years of research and innovation (a review). **Materials Today Bio**, v. 17, p. 100473, 15 dez. 2022.
- SALAMANNA, F. *et al.* **Nano-based biomaterials as drug delivery systems against osteoporosis: A systematic review of preclinical and clinical evidence.** **Nanomaterials**MDPI AG, , 1 fev. 2021.
- SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 10, p. 547–556, out. 2006.
- SANTHOSH, S. *et al.* Improved treatment efficacy of risedronate functionalized chitosan nanoparticles in osteoporosis: formulation development, in vivo, and molecular modelling studies. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1631401>, v. 36, n. 4, p. 338–355, 19 maio 2019.
- SANTOS, M. A. *et al.* Influence of post-ceramic processing on the synthesis of brushite/SrO/chitosan bone cement. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e43711730021–e43711730021, 30 maio 2022.
- SAVICKI, C. *et al.* Carregamento e caracterização do fármaco carboplatina na microestrutura microporosa do biomaterial granulado bifásico micro e nanoestruturado de fosfato de cálcio Characterization of carboplatin loaded micro-nanostructured porous granular material in a biphasic calcium phosphate ceramic system. **Revista Matéria**, v. 24, n. 1, 2019.

- SAVICKI, C.; ALMEIDA CAMARGO, N. H.; GEMELLI, E. Crystallization of carboplatin-loaded onto microporous calcium phosphate using high-vacuum method: Characterization and release study. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12 December, p. 1–24, 2020.
- SBEM. Conheça os números da osteoporose. **Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia - Regional de São Paulo**, 2017.
- SCHUMACHER, M. *et al.* Calcium phosphate bone cement/mesoporous bioactive glass composites for controlled growth factor delivery †. v. 5, p. 578, 2017.
- SHAO, F. *et al.* Ibuprofen loaded porous calcium phosphate nanospheres for skeletal drug delivery system. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 2, p. 1054–1058, 7 jan. 2012.
- SIDDIQUE, R.; MEHTA, A. Effect of carbon nanotubes on properties of cement mortars. **Construction and Building Materials**, v. 50, p. 116–129, 15 jan. 2014.
- SILVA, D. F. *et al.* Part II - Microstructural and physical of calcium phosphate biomaterials obtained from natural raw materials. **Materials Science Forum**, v. 881 MSF, p. 147–152, 2017.
- SILVA, D. F. DA. **Síntese e caracterização de biomateriais de fosfatos de cálcio a partir de conchas calcárias fossilizadas**. Joinville: UDESC, 2012.
- SILVA, D. F. DA. **Desenvolvimento de Biocerâmicas de Origem Fossilizada para Reconstrução e Neoformação Óssea**. 1 ed ed. Curitiba: Appris, 2018.
- SILVA, V. V. Aplicação de Biomateriais em Ortopedia e Engenharia de Tecido Ósseo. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2, p. 14–27, 2017.
- SINGH, P.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, S. K. Nanosilica: Recent Progress in Synthesis, Functionalization, Biocompatibility, and Biomedical Applications. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, n. 10, p. 4882–4898, 14 out. 2019.
- SOFRONIA, A. M. *et al.* Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite. **Materials Science and Engineering C**, v. 43, p. 153–163, 1 out. 2014.
- STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid And Interface Science**, 1968.
- SYCH, E. E. *et al.* The Structure and Properties of Calcium Phosphate Ceramics Produced from Monetite and Biogenic Hydroxyapatite. **Powder Metallurgy and Metal Ceramics**, v. 53, n. 7–8, p. 423–430, 1 nov. 2014.

SZCZEŚ, A.; HOŁYSZ, L.; CHIBOWSKI, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 321–330, nov. 2017.

TABATA, Y. **Biomaterial technology for tissue engineering applications**. **Journal of the Royal Society Interface**, 2009. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/>>

TANG, L.; CHENG, J. Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application. **Nano Today**, v. 8, n. 3, p. 290–312, jun. 2013.

TARAFDAR, J. C.; SHARMA, S.; RALIYA, R. Nanotechnology: Interdisciplinary science of applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 219–226, 2013.

TARIQ, U. *et al.* Injectable dicalcium phosphate bone cement prepared from biphasic calcium phosphate extracted from lamb bone. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109863, 1 out. 2019.

TEIXEIRA, J. M. C. *et al.* In vitro drug release study from hydroxyapatite-alumina composites. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 89, n. 2, p. 521–530, 15 fev. 2019.

VALENTE, M. DE C. Síntese de hidroxiapatita e sua aplicação como biomaterial. p. 107, 1999.

VALLET-REGÍ, M.; ARCOS, D. Bioceramics for drug delivery. **Acta Materialia**, v. 61, n. 3, p. 890–911, 1 fev. 2013.

VAN HOUTT, C. I. A. *et al.* Alendronate release from calcium phosphate cement for bone regeneration in osteoporotic conditions. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15398, 18 dez. 2018.

VIANA, J. R. *et al.* Comparative analysis of solid state hydroxyapatite synthesis. **Revista Materia**, v. 25, n. 1, 6 abr. 2020.

VORNDRAN, E. *et al.* Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 12, p. 9558–67, dez. 2013.

WAHEED, S. *et al.* Comparative Analysis of Hydroxyapatite Synthesized by Sol-gel, Ultrasonication and Microwave Assisted Technique. **Materials Today: Proceedings**, v. 2, n. 10, p. 5477–5484, mar. 2015.

WANG, X. D. *et al.* Preparation of spherical silica particles by Stöber process with high concentration of tetra-ethyl-orthosilicate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, n. 1, p. 23–29, mar. 2010.

- WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, mar. 2008.
- YAO, H. *et al.* Rheological Properties and Chemical Bonding of Asphalt Modified with Nanosilica. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 25, n. 11, p. 1619–1630, nov. 2013.
- YOO, J. W.; LEE, C. H. **Drug delivery systems for hormone therapy. Journal of Controlled Release** Elsevier, , 1 maio 2006. . Acesso em: 13 abr. 2021
- YU, T. *et al.* Synthesis and Drug Delivery Property of Calcium Phosphate Cement with Special Crystal Morphology. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 93, n. 5, p. 1241–1244, 1 jan. 2010.
- YUASA, T. *et al.* Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 25, n. 7–8, p. 1159–1166, 1 mar. 2004.
- ZANELATO, C. B. *et al.* Development of biphasic bone cement obtained from chicken eggshell. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n. 4, p. 7297–7304, 1 jul. 2020.
- ZANONI, E. T. *et al.* Síntese e avaliação de nanopartículas de sílica mesoporosas na liberação controlada de feromônios repelentes de abelha. **Cerâmica**, v. 65, n. 374, 2019.
- ZHANG, J.-Y. *et al.* Recent advance of small-molecule drugs for clinical treatment of osteoporosis: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 259, p. 115654, 5 nov. 2023.
- ZHANG, M. *et al.* Recent developments in biomaterials for long-bone segmental defect reconstruction: A narrative overview. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 22, p. 26–33, maio 2020.
- ZULFIQAR, U.; SUBHANI, T.; HUSAIN, S. W. Synthesis of silica nanoparticles from sodium silicate under alkaline conditions. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 77, n. 3, p. 753–758, mar. 2016.
- ZUO, X. *et al.* Porous silicon derived from 130 nm Stöber silica as lithium-ion battery anode. **Nano Select**, v. 2, n. 8, p. 1554–1565, 1 ago. 2021.