

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

HIDROXIAPATITA COMO SISTEMA PARA LIBERAÇÃO DE IBUPROFENO

000

nnn

000

Mariana de Brito Batista Pereira

João Pessoa - PB – Brasil

Agosto/2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

000

0.0.0

HIDROXIAPATITA COMO SISTEMA PARA LIBERAÇÃO DE IBUPROFENO

Mariana de Brito Batista Pereira*

nnı

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Gardênnia da Fonseca *Bolsista (CAPES)

João Pessoa - PB – Brasil

P436h Pereira, Mariana de Brito Batista.

Hidroxiapatita como sistema para liberação de ibuprofeno / Mariana de Brito Batista Pereira.- João Pessoa, 2014.

101f. : il.

Orientadora: Maria Gardênnia da Fonseca

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Química. 2. Hidroxiapatita. 3. Fármaco ibuprofeno. 4.Fosfato de cálcio. 5. Adsorção.

"De tudo que foi dito a conclusão é esta: Tema a Deus e obedeça aos seus mandamentos porque foi para isso que fomos criados ".

Ecl.12:13.

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, pela compreensão e apoio durante esta jornada, estando ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, aquele a quem devo a honra desta vitória e dom da vida;
- Aos meus pais Manuel e Alba por serem meu ponto de partida e eixo norteador dos meus valores, aos meus irmãos, Almério, Emanuelle e Milena, e sobrinhos Renan e Maria Clara pelo apoio, carinho e afetividade;
- Em especial ao meu esposo Josivaldo por mim ensinar todos os dias o valor da cumplicidade e do amor;
- À Prof^a Dra Maria Gardênnia da Fonseca, pela orientação, paciência e incentivo. Agradeço pela grande oportunidade cedida para realização desse trabalho e a Prof^a Dra Iêda Maria Garcia dos Santos pela coorientação;
- Ao Prof. Dr. Antônio Gouveia por disponibilizar este laboratório para a realização desse projeto;
- Aos queridos amigos: Denise, Saloana, Líbia, Graycyelle, Francisco, Alline Souza, Kaline, Cleibson e Leanderson, pessoas que me ajudaram nesta trajetória a quem sempre serei grata por todo apoio e momentos maravilhosos compartilhados.
- A Denise e Saloana pela amizade e grande ajuda em todos os momentos.
- Aos amigos do LACOM: Jacqueline Morais, Luzia Maria, Thiago Marinho, Juliana Kelly, Alex, Laís, Suellen, João Jarllys, KiKo, Ana Flávia, Anderson, Raquel, Abrão e Ana Rita;
- A Anne Josena, Oberto e José Hundemberg pelo apoio na pesquisa;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPB, pela oportunidade e apoio;
- À todos os professores do PPGQ da UFPB pelos conhecimentos transmitidos;
- Ao funcionário Marcos Pequeno;
- À CAPES pelo incentivo financeiro concedido.

RESUMO

Título: Hidroxiapatita como sistema para liberação de ibuprofeno

Autor: Mariana de Brito Batista Pereira

Orientadoras: Prof^a Dr^a Maria Gardênnia da Fonseca Prof^a Dr^a Iêda Maria Garcia dos Santos

A hidroxiapatita tem sido explorada como um excelente biomaterial por sua compatibilidade com o tecido ósseo, com ênfase para carregamento de fármacos. Este trabalho tem como objetivo sintetizar a hidroxiapatita com porosidade controlada por meio do método de co-precipitação, utilizando caseína como agente direcionador de estrutura, e avaliar a capacidade de carregamento do fármaco ibuprofeno pela hidroxiapatita obtida, visando aplicação em sistema de liberação controlada de fármaco. Portanto, no presente estudo a hidroxiapatita foi obtida pelo método da co-precipitação utilizando os sais de nitrato e cloreto de cálcio e fosfato de amônio. Os sólidos foram caracterizados por difratometria de raios X, medidas de adsorcão/dessorcão de nitrogênio, espectroscopia região do na infravermelho, termogravimetria e microscopia eletrônica de varredura. Um estudo sistemático de reprodutibilidade da síntese foi realizado. O sólido foi aplicado em ensaios de carregamento e liberação de ibuprofeno. As matrizes sintetizadas, sem e com agente direcionador, formaram materiais monofásicos, indexados à hidroxiapatita. Os valores de área superficial foram de 114 e 147 m² g⁻¹ para os sólidos obtidos com percussor cloreto de cálcio e nitrato de cálcio, respectivamente. Os estudos de carregamento do ibuprofeno indicaram maior incorporação do fármaco com a diminuição da polaridade solvente utilizando tempo de 24 horas a temperatura ambiente. As quantidades máximas de ibuprofeno carregado foram de 188 e 184 mg g⁻¹ em etanol e hexano, respectivamente em 120 e 360 min, indicando que HA mesoporosa proporciona boa capacidade de carregamento do fármaco. Os ensaios de liberação mostraram uma cinética rápida nas primeiras 24 h, seguida por uma cinética lenta. O equilíbrio foi atingindo após 38 h com máximo de liberação em torno de 97% do fármaco carregado no sólido mesoporoso.

Palavras-chaves: Fosfato de cálcio, fármaco, adsorção.

ABSTRACT

Title: Hydroxyapatite as ibuprofen drug delivery systems Author: Mariana de Brito Batista Pereira Supervisors: Prof^a Dr^a Maria Gardênnia da Fonseca Prof^a Dr^a Iêda Maria Garcia dos Santos

Hydroxyapatite has been explored as an excellent biomaterial due its compatibility with the bone tissue, mainly with application to the drug adsorption. This work aimed to synthesize hydroxyapatite with controlled porosity, through co precipitation method using casein as template and to investigate the loading capacity of the ibuprofen in the obtained hydroxyapatite. Therefore in this study, it was synthesized hydroxyapatites with the calcium nitrate, calcium chlorite e ammonium phosphate. The solids were characterized by X ray diffratometry, N₂ adsorption/dessorption measurements, infrared spectroscopy, thermogravimetry and scanning electron microscopy. The synthesis reproducibility was verified. The solid was used to carry and to deliver ibuprofen drug. The synthetized matrices, with and without template, formed monophasic compounds, which were indexed to hydroxyapatite. Surface area values were 114 e 147 m² g⁻¹ for the solids obtained with calcium chlorite and calcium nitrate, respectively. The loading study indicated higher drug incorporation when the solvent polarity decreased at 24 h and room temperature. For the adsorption tests, the maximum loading values were 188 and 184 mg g $^{\text{-1}}$ in ethanol and hexane, respectively at reaction times of 120 and 360 min. The release tests showed a fast kinetic at the first 24 h, and more slower process after this time. The equilibrium time was reached after 38 h with a maximum release about 97% for the ibuprofen on mesoporous solid.

Keywords: Calcium phosphate, drug, adsorption

Sumário

1. Introdução 2
1.1 Objetivos
1.1.1 Objetivo geral
1.1.2 Objetivos específicos 4
2. Revisão da literatura7
2.1 Biomateriais e biocerâmicas7
2.1.1 Fosfatos de cálcio8
2.1.1.1 Hidroxiapatita 11
2.1.1.2 Estrutura da hidroxiapatita13
2.1.2 Métodos de síntese da hidroxiapatita16
2.1.3 Hidroxiapatita mesoporosa 20
2.1.4 A caseína 25
2.1.5 Hidroxiapatita mesoporosa como sistema de liberação controlada de fármaco27
2.1.6 Cinética de liberação do fármaco
2.2 Ibuprofeno
3. Metodologia experimental 34
3.1 Reagentes químicos 34
3.2 Síntese de hidroxiapatita
3.3 Ensaios de carregamento do fármaco ibuprofeno na matriz hidroxiapatita
3.3.1 Efeito do tempo 39
3.3.2 Ensaios de liberação do ibuprofeno no fluido corporal simulado (SBF)
3.4 Técnicas de caracterização 43

3.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	43
3.4.3 Medidas de adsorção/dessorção de N ₂	44
3.4.4 Análise termogravimétrica	44
3.4.5 Análise elementar	44
3.4.6 Microscopia eletrônica de varredura	45
3.4.7 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)	45

4. Resultados e discussão	47
4.1 Caracterizações dos sólidos sintetizados	47
4.1.1 Difratometria de raios X (DRX)	47
4.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	51
4.1.3 Medidas de adsorção/dessorção de N₂	54
4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura	61
4.1.5 Reprodutibilidade das sínteses de HA porosa	63
4.2 Ensaios de carregamento com ibuprofeno	65
4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	65
4.2.2 Análise elementar	69
4.2.3 Termogravimetria	73
4.2.4 Efeito do tempo	76
4.2.5 Ensaio de liberação do ibuprofeno	77

5. (Conclusões 8	81	1
------	--------------	----	---

6.	Referências	bibliográficas	84
----	-------------	----------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura hierárquica do osso em várias escalas de	
comprimento (SADAT-SHOJAI <i>et al.</i> , 2013)	11
Figura. 2.2 - Visão da estrutura de HA ao longo do eixo	
c. Linhas pretas conectam Ca (I) em redes hexagonais.	
Triângulos escalonados de átomos de Ca (II) encontram-se no	
mesmo plano, mas a uma altura diferente em relação ao eixo c	
(BOANINIA <i>et al.</i> , 2010)	14
Figura 2.3 - Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo c.	
Adaptado de (ELLIOTT, 1994)	15
Figura 2.4 - Número total de artigos indexados na Scopus de	
1999 a 2011 pelo método de preparação. Adaptado (SADAT-	
SHOJAI <i>et al</i> ., 2013)	18
Figura 2.5 – Representação esquemática da síntese de fosfato	
de cálcio mesoporoso. Adaptado de (HATTON <i>et al.,</i> 2005)	22
Figura 2.6 - Estrutura molecular da a - e β -caseína. (SZYK-	
WARSZYNSKA <i>et al</i> ., 2009)	26
Figura 2.7 - Parâmetros que governam a capacidade de	
carregamento de moléculas biologicamente ativas. Adaptado de	
(VALLET-REGÍ, 2010)	29
Figura 3.1 - Estrutura química do ibuprofeno	34
Figura 3.2- Fluxograma da obtenção das matrizes porosas	37
Figura 3.3 - Sistema utilizado para síntese da hidroxiapatita	
porosa	38
Figura 3.4- Fluxograma de carregamento do ibuprofeno (IBU)	
na hidroxiapatita mesoporosa	39
Figura 3.5 – Representação do procedimento de implementa-	
ção do MAP por partição da amostra	41
Figura 4.1 - Difratograma de raios X da hidroxiapatita pura	48
Figura 4.2-Difratogramas de raios X das amostras (I) HA1puro	

(a), HA1A (b), HA1B (c) e (II) HA2puro (a), HA2A (b), HA2B	
(c)	48
Figura 4.3 - Espectros na região do infravermelho dos sólidos	
(I) HA1puro (a), HA1A (b) e HA1B (c) e (II) HA2puro (a), HA2A	
(b) e HA2B (c)	52
Figura 4.4 – Isotermas de adsorção/dessorção e distribuição de	
tamanho de poros dos sólidos HA1puro, HA1A e HA1B	56
Figura 4.5 – Isotermas de adsorção/dessorção e distribuição de	
tamanho de poros dos materiais HA2puro, HA2A e HA2B	57
Figura 4.6 - Microscopias eletrônicas de varredura para	
hidroxiapatita pura	62
Figura 4.7 - Microscopias eletrônicas de varredura para	
hidroxiapatita mesoporosa	62
Figura 4.8 – Difratogramas de raios X das amostras HA1A	
referentes às sínteses I, II e III	63
Figura 4.9 – Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e	
distribuição de tamanho para as amostras HA1A referentes às	
sínteses I, II e III	64
Figura 4.10 - Espectros na região do infravermelho do sólido	
HA1puro carregado com ibuprofeno nos solventes água (a),	
etanol (b) e hexano (c) em comparação com sólido sem fármaco	
(d) a 298 K	66
Figura 4.11 - Espectros na região do infravermelho do sólido	
HA1A carregado com ibuprofeno nos solventes água (a), etanol	
(b) e hexano (c) em comparação com sólido sem fármaco (d) a	
298 K	67
Figura 4.12 - Espectros na região do infravermelho do sólido	
HA1B carregado com ibuprofeno nos solventes água (a), etanol	
(b) e hexano (c) em comparação com sólido sem fármaco (d) a	
298 K	68
Figura 4.13 - Possíveis localizações das moléculas de fármaco	
nos mesoporos de um material mesoporoso bioativo. Adaptado.	

(ARCOS e VALLET- REGÍ 2013)	72
Figura 4.14 – Curvas termogravimétricas para os sólidos HA1A,	
carregado com ibuprofeno nos solventes água (a), etanol (b) e	
hexano (c) em comparação com sólido sem fármaco (d) a 298	
κ	73
Figura 4.15 - Isoterma de tempo do carregamento de	
ibuprofeno no sólido HA1B em hexano (a) e em etanol (b) a 298	
К	77
Figura 4.16 - Perfil de liberação do ibuprofeno na matriz	
mesoporosa HA1B a temperatura de 310 K no fluido corpóreo	
simulado	78
Figura 4.17 – Modelo de Higuchi para o estudo da liberação do	
ibuprofeno na matriz HA1B no fluido corpóreo simulado a 310K	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Classificação dos fosfatos de cálcio segundo a razão	
Ca/P	10
Tabela 2.2 – Alguns sistemas de liberação de fármaco de diversos	
fosfatos de cálcio	30
Tabela 3.1 – Denominação dos sólidos obtidos	36
Tabela 4.1 – Parâmetros de rede dos sistemas HA1puro, HA1A,	
HA1B e HA2puro, HA2A, HA2B	50
Tabela 4.2 – Relação entre área superficial e largura a meia	
altura dos sólidos sintetizados	51
Tabela 4.3 – Principais absorções na região do infravermelho para	
os materiais sintetizados	53
Tabela 4.4 - Dados das propriedades texturais obtidos a partir	
das medidas de adsorção/dessorção de N ₂ para os sólidos	
sintetizados em que S_{BET} é a área obtida pelo método BET,	
Langmuir é a área, Vp e Dp são volume e diâmetro médio de	
poro	60
Tabela 4.5 - Dados das propriedades texturais obtidos a partir	
das medidas de adsorção/dessorção de N_2 para os sólidos	
mesoporos HA (precursor cloreto), em que S_{BET} é a área obtida	
pelo método BET, Langmuir é a área, Vp e Dp são volume e	
diâmetro médio de poro	64
Tabela 4.6 – Análise elementar de carbono e nitrogênio para as	
amostras HA1puro, HA1A e HA1B carregados com o ibuprofeno	
nos solventes água, etanol e hexano	70
Tabela 4.7 - Dados da análise termogravimétrica para os sólidos	
HA1A carregados com o ibuprofeno nos solventes água, etanol e	
hexano	74

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

HA	Hidroxiapatita.						
HA1puro	Hidroxiapatita pura com precursor cloreto de cálcio.						
HA2puro	Hidroxiapatita pura com precursor nitrato de cálcio.						
HA1A	Hidroxiapatita mesoporosa com precursor cloreto de						
	cálcio não calcinada.						
HA1B	Hidroxiapatita mesoporosa com precursor cloreto de						
	cálcio calcinada.						
HA2A	Hidroxiapatita mesoporosa com precursor nitrato de						
	cálcio não calcinada.						
HA2B	Hidroxiapatita mesoporosa com precursor nitrato de						
	cálcio calcinada.						
SBF	Simulated body fluid (Fluido corporal simulado).						
S _{BET}	Área superficial específica						
qt	Quantidades adsorvidas por unidade de massa em um						
	determinado instante						
Qt	Quantidade de final liberada						
D	Coeficiente de difusão						
S	Solubilidade do medicamento						
A	Teor de fármaco/cm ³						
K _H	Constante da taxa de liberação/ Higuchi						
SBA	Soro Albumina						
Т	Temperatura						
Т	Тетро						
рН	Potencial Hidrogeniônico						
N ₂	Nitrogênio						
К	Kelvin						
FWHM	The half width (Largura a meia altura)						
CTAB	Hexadeciltrimetilamônio						
SDS	Sulfonato de alquilbenzeno dodecil sulfato de sódio						
MAP	Método por adição de padrão						

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

Os biomateriais cerâmicos têm sido alvo de grande interesse na área biomédica e dos materiais, por este motivo, avanços na utilização destes têm sido relatados no campo de enxertos, reparação óssea e odontológica, por serem eficazes, seguros e biologicamente aceitáveis (HOLZAPFEL *et al.*, 2013).

Neste contexto, os fosfatos de cálcio evidenciam-se como excelentes biomateriais por apresentarem biocompatibilidade, biodegrabilidade e, portanto, estão em ativo bioatividade e desenvolvimento (GUO et al., 2013). Dentre este grupo destaca-se a hidroxiapatita (HA), cuja a fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, que é um dos biomateriais mais investigados na pesquisa acadêmica dentre os fosfatos de cálcio, devido à sua semelhança com à fase inorgânica dos ossos e dentes e por apresentar propriedades osteocondutivas, bem como ausência de toxicidade local e sistêmica (ARCOS e VALLET-REGÍ, 2013). Os fosfatos de cálcio ainda apresentam aplicações em áreas distintas como, por exemplo, na catálise, como materiais com fluorescência, sensores químicos, na adsorção de metais, tratamento de água e em cromatografia como suportes (AGHAYAN e RODRÍGUEZ, 2012).

O estudo sobre hidroxiapatita e outros biomateriais porosos com elevada área superficial abriu novas possibilidades de aplicações à nanociência, principalmente no estudo de desenvolvimento de sistemas que possibilitem a incorporação e liberação de moléculas farmacêuticas, devido à sua estrutura e arranjo de poros ordenados e distribuição estreita de poros, propriedades que são essenciais para as aplicações fisiológicas e terapêuticas (KLEINER *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2014).

Diversos métodos de sínteses são relatados na literatura para a obtenção de hidroxiapatita, contudo a metodologia mais utilizada é a de co-precipitação, pois permite um melhor controle dos parâmetros de morfologia e porosidade, produzindo o material monofásico, além de ser uma técnica relativamente simples e de fácil aplicação, quando comparada aos métodos como síntese no estado sólido, método de combustão e da emulsão. Entretanto, o tempo longo de reação é considerado uma desvantagem deste método (AHMED *et al.*, 2014; SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).

A síntese dos fosfatos mesoporosos é dirigida principalmente por direcionadores de poros derivados do petróleo, o que pode prejudicar a biocompatibilidade destes materiais. Neste trabalho está sendo utilizado um biomaterial, neste caso a caseína, tendo em vista que a mesma é constituída de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas e possui atividade anfipática e alta afinidade por fosfatos de cálcio (VERMA *et al.*, 2013; YE *et al.*, 2013), sendo assim apresenta-se como um promissor biosurfactante na síntese desses materiais mesoporosos.

Outro enfoque deste trabalho foi a aplicação dos materiais obtidos em sistemas de liberação de fármacos, neste caso o ibuprofeno, ácido 2-[4-(2-metilpropil)fenil] propanóico, com fórmula molecular C₁₃H₁₈O₂. Este fármaco é utilizado para o tratamento ósseo e possui grande importância médica e comercial (KIM et al., 2012), atuando como analgésicos e anti-inflamatório não esteróidal (BAUM et al., 1985). É bastante investigado em estudo de liberação controlada, devido à sua e excelente atividade farmacológica e pelo tamanho da molécula, cuja dimensão estimada é de aproximadamente 1,0 x 0,6 nm, o que permite a sua incorporação diretamente nos poros do sólido, permitindo, portanto, sua interação com material mesoporoso (ONER et al., 2011; ZHU et al., 2014). A presença de um grupo carboxílico é responsável pelas interações entre o fármaco e os biomaterias, proporcionando a formação de ligações de hidrogênio com os grupos disponíveis nas superfícies e no interior dos poros (AGHAEI et al., 2014; ONER et al., 2011).

3

No presente estudo, a hidroxiapatita (HA) foi sintetizada pelo método de co-precipitação, utilizando a caseína como direcionador para obtenção de HA com elevada área superficial e diâmetros de poros ordenados. O material obtido foi aplicado em sistema de carregamento do ibuprofeno sendo realizado o estudo da liberação em fluído corpóreo simulado.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Sintetizar a hidroxiapatita com porosidade controlada, utilizando caseína como agente direcionador de estrutura, por meio do método de co-precipitação. Avaliar a capacidade de carregamento do fármaco ibuprofeno pela hidroxiapatita obtida, visando aplicação em sistema de liberação controlada de fármaco.

1.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar hidroxiapatita Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ mesoporosa e não mesoporosa partindo dos precursores cloreto de cálcio e nitrato de cálcio;
- Caracterizar os materiais obtidos pelas técnicas de adsorçãodessorção de N₂, espectroscopia na região do infravermelho, análise elementar, termogravimetria, difratometria de raios X e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Verificar a influência dos solventes com diferentes polaridades no estudo de carregamento do fármaco ibuprofeno;

- Avaliar a capacidade de carregamento de hidroxiapatitas mesoporosa e não mesoporosa frente ao fármaco ibuprofeno, verificando a influência do tempo e dos solventes água, etanol e hexano;
- Caracterizar estruturalmente as matrizes após a interação com o fármaco, pelas técnicas de análise elementar, difração de raios X, espectroscopia na região do infravermelho e termogravimetria;
- Realizar os ensaios de liberação do fármaco frente ao fluido simulado corpóreo (SBF).

Capítulo 2

Revisão da literatura

2. Revisão da literatura

2.1 Biomateriais e biocerâmicas

Biomateriais ou materiais biomédicos são definidos como materiais sintéticos ou naturais a serem utilizados para substituir partes de um sistema vivo, ou para funcionar em contato com os tecidos vivos (MANZANO e VALLET-REGÍ, 2012; BOHNER, 2000). Outras definições têm sido relatadas, mas todas se referem à biomateriais como materiais associados com o domínio da saúde, que se posicionam como uma interface, interagindo com os tecidos vivos (DOROZHKIN, 2010).

Os biomateriais se diferenciam dos outros grupos de materiais em virtude de sua capacidade de permanecer no ambiente biológico, sem comprometer o meio e sem serem danificados no processo (HUANG *et al.*, 2014; WILLIAMS, 2009). Assim, biomateriais são associados com o domínio de cuidados com a saúde e devem ter uma interface que não produza qualquer resposta biológica adversa, ou seja: os materiais não devem apresentar toxicidade local ou sistêmica quando utilizados em uma série de aplicações fisiológicas (FAROOQ *et al*, 2014).

Um exemplo de biomateriais são as cerâmicas biomédicas, que também tem sido alvo de grande interesse na área biomédica e dos materiais. A investigação sobre as cerâmicas para aplicações em tecido vivo está em desenvolvimento desde 1960. Biocerâmicas são definidas como biomateriais da cerâmica e apresentam-se inicialmente como uma alternativa para aumentar а biocompatibilidade dos implantes com metais (DOROZHKIN, 2010; et al., 2002). As primeiras BARRALET biocerâmicas foram desenvolvidas foram à base de zircônia e alumina, sendo aplicadas para fabricar próteses de quadril. Atualmente as biocerâmicas proporcionam um legue de aplicações, a maioria relacionada à área

do sistema ósseo, por exemplo, para implantes periodontais e enxertos. No entanto, alguns tipos de biocerâmicas ainda dispõem de capacidade de entrega de liberação de fármacos (ESPANOL *et al.*, 2009; VALLET-REGÍ e COLILLA, 2011).

classificação desses biomateriais é dividida em três Α categorias: as cerâmicas bioinertes, que são materiais que resposta danosa mínima ou apresentam nula devido a sua estabilidade química (SAMAVEDIA et al., 2013), as bioativas, que possibilitam a ligação entre o tecido vivo e próprio material e ainda as bioreativas, que são usualmente as que ficam no limite entre os materiais bioinertes e os bioativos.

Estas características, aliadas às propriedades mecânicas, são as principais propriedades que proporcionam as biocerâmicas excelente desempenho no campo biomédico (SAMAVEDIA *et al.*, 2013).

Tendo em vista aos diversos tipos de biomateriais existentes, nesta revisão será dada ênfase aos fosfatos de cálcio, que são o objeto de estudo deste trabalho.

2.1.1 Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio abrangem uma família ampla de materiais cerâmicos, que possuem um merecido lugar de destaque entre os biomateriais e biocerâmicas, principalmente por apresentarem ausência de toxicidade local e sistêmica e ausência de respostas a corpos estranhos ou inflamações. Estes materiais foram inicialmente propostos em 1920, por Albee e Morrisson, sendo desde então investigados para aplicações biotecnológicas (ELLIOT, 1994; LEGEROS, 2002; VALLET-REGÍ, 2010).

Os biomateriais de fosfatos de cálcio são utilizados em uma série de diferentes aplicações em todo o corpo, incluindo implantes dentários, dispositivos percutâneos e no tratamento periodontal, em

8

implantes para reparar e reconstruir os tecidos (FERNANDES *et al.*, 2011), no tratamento de defeitos ósseos, na substituição total da articulação, reconstrução crânio-maxilo-facial, em otorrinolaringologia, em cirurgia da coluna, na substituição do globo ocular etc. São empregados também na produção de fertilizantes, em colunas cromatográficas e na indústria de alimentos (BOHNER, 2000; BOUTINGUIZA *et al.*, 2012).

Os fosfatos de cálcio de relevância biológica são principalmente os amorfos, hidroxiapatita e demais apatitas, monetita, brushita, fosfato octacálcio, fosfato tricálcio e pirofosfato de cálcio. Dentre as fases minerais presentes em calcificações normais, ou seja, não patológicas, as apatitas são comumente referidas (FERNANDES *et al.*, 2011; WILLIAMS, 2009).

Algumas das propriedades de aplicação destes materiais, incluindo a sua influência sobre os tecidos biológicos e especialmente o seu comportamento de biodegradação e interação são determinadas pela sua composição química, pela morfologia e topologia da superfície (MOUTHUY *et al.*, 2013; BOUTINGUIZA *et al.*, 2012).

Os fosfatos de cálcio incluem um grande número de materiais, cuja classificação está baseada na razão Ca/P, conforme apresentada na Tabela 2.1. Também são listados, além das fórmulas químicas, os dados referentes à estrutura cristalina, o grupo espacial e suas abreviações internacionais.

Nome	Fórmula	Ca/P	Símbolo	Estrutura cristalina	Grupo espacial
Hidroxiapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	HA	hexagonal	P63/m
Cloroapatita	$Ca_{10}(PO_4)_6(CI)_2$	1,67	Clap	hexagonal	P63/m
Fluoroapatita	$Ca_{10}(PO_4)_6(F)_2$	1,67	Fap	hexagonal	P63/m
Fosfato octacálcio	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄)n.5H ₂ O	1,33	OCP	triclínica	P1-
Fosfato tetracálcio	$Ca_4(PO_4)_2$	2	terCP	monoclínica	P21
Fosfato de cálcio amorfo	$Ca_3(PO_4)_2$. nH ₂ O	1,5	ACP		
Fosfato dicálcio dihidratado	CaHPO ₄ .2H ₂ O	1	DCPD	monoclínica	Ia
Fosfato dicálcio anidro	CaHPO₄	1	DCPA	triclínica	Р1
Fosfato a – tricálcio	a-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	a-TCP	monoclínica	P21/a
Fosfato β- tricálcio	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	β-ΤСΡ	romboedra	R3c

Tabela 2.1 Classificação dos fosfatos de cálcio segundo a razão Ca/P.

Fonte: Silva O. G. 2006

Os pesquisadores separam este grande grupo em duas classes, a primeira compõem os denominados fosfatos de baixa temperatura, estes são obtidos em soluções aquosas à temperaturas ambientes, estão nesta categoria os DCPA, DCPD, OCP e ACP. A segunda classe comporta os fosfatos obtidos à temperaturas moderadas e elevadas os quais são α -TCP, β -TCP, HA, TecCP (BOHNER, 2000).

As características como a estequiometria variável, biocompatibilidade, densidade de superfície de carga, funcionalidade e propriedades de dissolução tornam os fosfatos de cálcio adequados para liberação de fármacos e moléculas biológicas (IVANOVA *et al.*, 2014).

2.1.1.1 Hidroxiapatita

Entre os biomateriais cerâmicos de fosfato de cálcio, o mais amplamente utilizado é a hidroxiapatita (HA), devido à sua composição química semelhante ao constituinte inorgânico da fase mineral dos dentes e ossos, representando cerca de 30% a 70% da massa, como ilustrado na Figura 2.1 (GINEBRA *et al.*, 2006; SADAT-S HOJAI *et al.*, 2013). A HA é um mineral que pode ser encontrado em rochas ígneas, metamórficas e em solos calcáreos (ELLIOTT, 1994; VALLET - REGÍ, 2011).

Figura 2.1- Estrutura hierárquica do osso em várias escalas de comprimento (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).



É reconhecido como o material mais biocompatível, em virtude de sua analogia com o osso (IVANOVA *et al.*, 2014; CHAI *et al.*, 2012). Além disso, a elevada reatividade deste material, a nanoestrutura, a bioadesão e cinética de dissolução favorável são reportadas como vantagens para sua aplicação no organismo humano (ZHOU e LEE, 2011). Estas propriedades lhe garante uma característica osteocondutora, que pode ser definida como a formação de osso sobre superfícies de biomateriais guiada por meio de um processo bioativo, além das outras características intrínsecas aos biomateriais já mencionadas (ABDAL-HAY *et al.*, 2014; BOSE e TARAFDER, 2012).

A biocompatibilidade da hidroxiapatita somada com sua capacidade adsorvente possibilita a incorporação de moléculas biologicamente ativas em sua estrutura. Deste modo, destaca-se como potencial veículo para a distribuição do agente terapêutico (KLEINER et al., 2014; GINEBRA et al., 2012). A importância geral da HA também levou à numerosas aplicações industriais e tecnológicas não médicas, como: catalisador para reações químicas, como na adição do tipo Michael, oxidação do metano, materiais fluorescentes (LI et al., 2008), de íons condutores e os sensores de gás (MAHABOLE, et al., 2005) etc. HA sintética pode ser usada em cromatografia de coluna de fracionamento simples e rápido de proteínas e ácidos nucléicos (SADAT-SHOJAI et al., 2013). Além disso, a hidroxiapatita tem sido aplicada nos processos de tratamento de água (AGHAYAN e RODRÍGUEZ, 2012) e recuperação de solos contaminados com metais (HASHIMOTO et al., 2009). Bem como no desenvolvimento de materiais de restauração dentária e em outras aplicações odontológicas. (Zheng et al., 2013).

12

2.1.1.2 Estrutura da hidroxiapatita

O termo apatita aplica-se a um grupo de materiais que apresentam a fórmula geral $M_{10}(ZO_4)_6X_2$ (ELLIOT, 1973; HEIMANN, 2013), em que M é um metal, podendo ser Ca, Pb, Cd, Ir, La, Ce, K, Na, Z inclui os elementos P, V, As, Cr, S, C, Al, S e X é um ânion como OH⁻, Cl⁻, F⁻ e CO₃²⁻ ou ainda H₂O. O nome específico de cada apatita depende dos elementos ou radicais M, Z e X. Nesses termos, a hidroxiapatita tem a estrutura molecular de apatita, onde M é o Ca²⁺, Z é o P⁵⁺ e X é o OH⁻, originando a hidroxiapatita estequiométrica com relação atômica Ca/P de 1,67 (ELLIOT, 1999; BOANINIA *et al.*, 2010).

A hidroxiapatita geralmente exibe conformação hexagonal, com parâmetros de rede a = b = 0,9432 nm, c = 0,6881 nm e Z = 1, pertencente ao grupo espacial $P6_3/m$, onde P indica o sistema hexagonal primitivo. A estrutura pode ser descrita como um conjunto de fosfatos atravessado por canais paralelos preenchidos por íons OH⁻, paralelo ao eixo c (HEIMANN, 2013; MAVROPOULUS, 2002). Ela contém dois locais de cátions não equivalentes em sua célula unitária, denominado sítios Ca (I) e Ca (II), onde estão distribuídos os dez átomos de cálcio, sendo 4 cálcio no sítio I, estes são alinhados em colunas e 6 cálcio no segundo sítio, estes estão organizados em triângulos equiláteros em planos perpendiculares ao eixo c, um no plano ¼ e outro em ¾ de maneira que sua projeção no plano ab, forma um hexágono (HEIMANN, 2013; MAVROPOULUS, 2002). Estes dois sítios presentes na estrutura ocasionam implicações importantes para as hidroxiapatitas, que contêm impurezas catiônicas, uma vez que suas propriedades estruturais podem ser comprometidas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza (HEIMANN, 2013).

Os íons de cálcio do sítio (I) estão coordenados por seis átomos de oxigênio dos tetraedros do grupo fosfato e com outros três oxigênios a uma distância média de 0,225 nm, e são posicionados em colunas paralelas aos canais de hidroxilas. Enquanto que os íons de Ca (II) são cercados por sete oxigênios relativamente afastados, conforme ilustrado na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Visão da estrutura de HA ao longo do eixo *c*. Linhas pretas conectam Ca (I) em redes hexagonais. Triângulos escalonados de átomos de Ca (II) encontram-se no mesmo plano, mas a uma altura diferente em relação ao eixo *c* (BOANINIA *et al.*, 2010).



É interessante notar que o íon PO_4^{3-} se encontra entre os sítios de Ca (I) e Ca (II). Dos quatro átomos de oxigênio que constituem os grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção *c* e os outros dois são paralelos a esta direção (BOANINIA *et al*, 2010).

Vale ressaltar que a disposição dos átomos de Ca (II) parece formar um hexágono, mas na verdade são dois triângulos equiláteros sobrepostos e no centro deles se encontra os íons hidroxilas, que na estrutura hexagonal ocupa apenas 50% das posições estatisticamente possíveis (BOANINIA *et al.*, 2010; ELLIOTT,1994). Na Figura 2.3 é possível visualizar a organização com mais clareza. **Figura 2.3** - Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo *c.* Adaptado de (ELLIOTT, 1994).



Os átomos Ca (I) são rigorosamente alinhados em colunas e qualquer alteração nas interações de metal-oxigênio afeta toda a estrutura (BOANINIA *et al.,* 2010). Na célula unitária existem dois canais de cálcio, um ocupado por Ca (I) em z = 0 e em $z = \frac{1}{2}$ do parâmetro cristalino e em $z = \frac{1}{4}$ e $z = \frac{3}{4}$ encontram-se os íons de cálcio do sítio (II) (ELLIOTT, 1994).

A estrutura da hidroxiapatita pode permitir substituições dos íons de Ca²⁺, PO₄³⁻ e OH⁻ por outros grupos. As substituições isomórficas podem afetar os parâmetros de rede, a morfologia do cristal, a cristalinidade, a solubilidade, propriedades espectrais de absorção no infravermelho e estabilidade térmica de HA. As trocas catiônicas podem ocorrer com íons divalentes como Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Sr²⁺,Co²⁺ ou Fe²⁺ e mesmo outros íons como Y³⁺ e K⁺. Substituições aniônicas ocorrem nas posições de fosfato ou hidroxila e as trocas mais importantes ocorrem quando os íons Cl⁻, F⁻ e CO₃²⁻ substituem o OH⁻ e quando CO₃²⁻, AsO₄³⁻ e VO₄³⁻ substituem o PO₄³⁻ (BOANINIA *et al.*, 2010). Fluoroapatita e clorapatita são exemplos comuns de hidroxiapatita aniônicamente substituída. Elas exibem uma estrutura semelhante à HA. No caso da fluoropatita, sua estrutura é mais estável e menos solúvel que a hidroxiapatita, além do que a ação do flúor na prevenção de cáries e no tratamento de osteoporose é motivo de estudo, por isso a fluoroapatita apresenta grande interesse biológico (LALA *et al.*, 2013).

Existem dois tipos de substituição de carbonato propostos na literatura, sendo estes a substituição de $CO_3^{2^-}$ para OH^- (tipo A) e $CO_3^{2^-}$ para $PO_4^{3^-}$ (tipo B) e ambas as substituições podem influenciar os parâmetros cristalográficos do material. As carboapatitas são investigadas como promissoras para aplicações em enxertos e suportes ósseos (LALA *et al.*, 2013).

A hidroxiapatita pode apresentar-se ainda na forma monoclínica quando o deslocamento das hidroxilas causa deformação na rede, apresentando grupo espacial P2₁/b, e parâmetros de rede a = 0,9421 nm, b = 2a e c= 0,6881 nm (ELLIOT, 1994). Contudo apenas a fase hexagonal é de importância prática, porque a forma monoclínica é desestabilizada facilmente (BOANINIA *et al.*, 2010).

2.1.2 Métodos de síntese da hidroxiapatita

As características críticas da hidroxiapatita e as propriedades como morfologia, área superficial, volume e diâmetro de poros, propriedades mecânicas, estabilidade térmica e permeabilidade da superfície estão relacionadas diretamente com o método de síntese (AMER *et al*, 2013; SADAT-SHOJAI *et al*., 2013). A literatura relata uma variedade de procedimentos de sínteses para a obtenção da hidroxiapatita densa e porosa que, embora diferentes em termos das condições específicas, são desenvolvidos almejando o aprimoramento das propriedades dos biomateriais (AHMED *et al*., 2014). Os principais métodos de preparação podem ser classificados em cinco grupos:

 a) Métodos de via úmida: contempla principalmente os procedimentos hidrotermais, hidrólise, sol-gel, emulsão, sonoquímico e co-precipitação.

O método de co-precipitação, é um dos mais promissores para a síntese de nanopartículas de hidroxiapatita, pois, o sólido obtido possui características similares às do tecido ósseo e dentário, (AMINZARE et al., 2013) diferentemente da hidroxiapatita sintetizada à altas temperaturas. A reação de precipitação é, realizada obedecendo aos principais parâmetros, como pH alcalino, agitação contínua, adição lenta dos precursores mantendo a razão molar Ca/P e tempo de maturação. Uma das principais vantagens é a temperatura que pode variar desde a temperatura ambiente até valores próximo ao ponto de ebulição da água, contudo a temperatura baixa é preferível (DONGDONG et al., 2013; AMER et al., 2013). O pó resultante geralmente apresenta baixa cristalinidade comparada com os outros métodos, o que pode ser uma vantagem ou desvantagem dependendo do objetivo da aplicação. Umas das principais desvantagens é o tempo reacional longo, principalmente durante o procedimento de maturação e adição dos reagentes, o que dificulta a produção de grandes quantidades de HA (DONGDONG et al., 2013). As seguintes equações simplificadas mostram algumas das reações químicas conhecidas adotadas para a síntese de HA via método de co-precipitação.

$$\begin{split} 10 CaCl_{2(aq)} \ + \ 6(NH_4)_2 HPO_{4(aq)} \ + \ 8NH_4 OH_{(aq)} \ \to \ Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2(s)} \ + \\ 20 NH_4 Cl_{(aq)} \ + \ H_2 O_{(I)} \end{split}$$

$$\begin{split} &10 Ca(NO_3)_{2(aq)} \ + \ 6(NH_4)_2 HPO_{4(aq)} \ + \ 20 NaOH_{(aq)} \rightarrow \ Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2(s)} \\ &+ \ 20 NaNO_{3(aq)} \ + \ 12 NH_{2(aq)} \ + \ 18 H_2 O_{(I)} \end{split}$$

A facilidade de condução da síntese e os precursores não dispendiosos garantem a popularidade deste método, que segundo o estudo estatístico apresentado na Figura 2.4 (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013) indica que durante o período de 1999 a 2011 cerca de 165 publicações sobre a síntese do fosfato de cálcio disponíveis estavam ligadas ao método de precipitação química convencional.

Figura 2.4 - Número total de artigos indexados na Scopus de 1999 a 2011 pelo método de preparação. Adaptado (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).



O método hidrotermal também desperta o interesse dos pesquisadores e pode ser identificado pela obtenção de HA estequiométrica e cristalina, à temperatura elevada, onde o período de envelhecimento é conduzido em autoclave a pressões elevadas, no entanto o controle de morfologia e o custo elevado são pontos negativos deste procedimento (LIN *et al.*, 2011).

O processo de hidrólise consiste na transformação/hidrólise de algumas fases como DCPD e DCPA em HA. Este tipo de conversão não tem sido atrativo na síntese de HA, provavelmente devido à hidrólise lenta dos fosfatos de cálcio (GUO *et al.*, 2013).

O método sol-gel oferece boa homogeneidade ao produto, que normalmente é realizado a baixa temperatura e apresentam estrutura estequiométrica com elevada área superficial e tamanho variando de 50 nm a 1 μ c, contudo inclui a formação de fase secundária, geralmente de óxido de cálcio, o que é prejudicial à biocompatibilidade da HA (KAYGILI *et al.*, 2014).

A metodologia de emulsão é fundamentada na dispersão de dois líquidos imiscíveis tais como água e óleo na presença de agentes tensoativos, apresentando dependência do surfactante para a obtenção de partículas pequenas e com morfologia controlada (FUJII *et al.*, 2013).

Um dos métodos mais recente é o sonoquímico, este baseia-se nas reações quimicamente ativadas por irradiação de ultra-som, sendo um método rápido, permite a obtenção de partículas nanométricas (GOPI *et al*, 2012; MEHRALIA *et al*, 2014).

b) Métodos secos: incluem as sínteses de estado sólido e a metodologia mecanoquímica (também conhecido como liga mecânica). De modo geral estes se apresentam vantajosos por serem procedimentos relativamente simples, que não requerem condições controladas com precisão, entretanto como desvantagem o pó sintetizado por estado sólido exibe algumas vezes heterogeneidade na sua composição, o que implica no pequeno interesse na utilização deste método. Já com o método mecanoquímico geralmente o produto possui uma estrutura bem definida, além de ser reprodutível (FAHAMI *et al.*, 2011).

c) Processos de alta temperatura: envolve uma técnica de combustão, que é um modelo convencional para a preparação de óxidos cerâmicos. A obtenção de HA em combustão envolve uma reação redox exotérmica e rápida entre o oxidante nitrato de cálcio e um combustível orgânico que pode ser uréia, ácido cítrico entre outros (ZHAO *et al.*, 2014). Outro processo é a pirólise também conhecido como "spray pirólise" ou método aerossol que envolve a pulverização das soluções precursoras em uma chama usando um gerador de ultra-som e o produto é um material altamente cristalino, entretanto pode apresenta outas fases e baixa área superficial, além de ser relativamente oneroso (CHO *et al.*, 2013; HONDA *et al.*, 2013).

d) Método de síntese com base em fontes biogénica: consiste na realização da síntese da HA utilizando matéria prima extraída de bioresíduos, tais como cascas de ovos, exoesqueleto de organismos marinhos, biomembranas de bambu, ossos bovinos e de peixes como fonte de cálcio e fósforo. Tem como vantagem o benefício econômico e ambiental, a HA obtida é geralmente semelhante à biológica, contudo é um processo demorado, que necessita de elevada temperatura. (MONDAL *et al.*, 2010; FELSEN *et al.*, 2014).

e) Procedimentos de combinação: é a soma de dois ou mais métodos distintos, criando uma estratégia sinérgica, ou seja, com a união dos procedimentos as propriedades do produto final tornam-se aperfeiçoadas, quando comparada com a obtenção das técnicas isoladas. As combinações mais reportadas são hidrotermalmecanoquímica, hidrotermal-hidrólise e hidrotérmica-microemulsão (ABDEL-AAL *et al.*, 2008; TIAN *et al.*, 2008).

2.1.3 Hidroxiapatita mesoporosa

Estudos têm sido focados no desenvolvimento de materiais que apresentam estrutura porosa e ordenado, ou seja, distribuição estreita de poros, elevada área superficial e volumes de poros relativamente grandes (GUO *et al.*, 2014; PRAMANIK e IMAE, 2012),
visando principalmente melhorar significativamente a bioatividade e biocompatibilidade desses materiais. Destacando ainda que estas propriedades são essenciais para o desenvolvimento das áreas de catálise, adsorção, nanotecnologia e ecologia (ZENG *et al.*, 2014).

Materiais que apresentam mesoporos recebem um enfoque maior, estes são classificados segundo a IUPAC como materiais que dispõem de diâmetro na faixa de 2 a 50 nm, enquanto que os materiais macroporosos possuem diâmetro superior a 50 nm e os materiais que exibem diâmetros menores que 2 nm, são denominados de microporosos, este último são adequados como suportes para engenharia de tecidos (ZENG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014).

A síntese de materiais mesoporosos está baseada na utilização de um surfactante como agente direcionador de estrutura. O surfactante é dissolvido numa solução aquosa e as moléculas tensoativas formam agregados denominados micelas (BASTOKOTI *et al.*, 2012). Os precursores da estrutura inorgânica são precipitados através da organização destes reagentes em torno das micelas, onde a mesoestrutura é obtida seguindo condições de síntese adequadas. O direcionado pode ser removido por extração com solvente e/ou por calcinação (LIU *et al.*, 2014). A Figura 2.5 representa este processo Este método de moldação é uma das vias mais eficazes para a síntese de matrizes mesoporosas ordenadas e desordenadas. A sua forma e tamanho depender de vários fatores, tais como a natureza e composição química do surfactante, concentração, pH, temperatura, entre outros (ZENG *et al.*, 2014; VALLET-REGI *et al.*, 2011).

Figura 2.5 – Representação esquemática da síntese de fosfato de cálcio mesoporoso. Adaptado de (HATTON *et al.*, 2005).



Uma grande variedade de surfactantes tem sido utilizada como moldes na síntese de materiais nanoestruturados. Alguns são sintetizados a partir de derivados do petróleo, o que resulta na busca de direcionadores naturais. São aplicados em diversas vertentes atuando como: efeito de espuma, modificador de superfícies, emulsificação, dispersão de fases, solubilização, proteção ambiental e proteção da saúde (VERMA *et al.*, 2013; YE *et al.*, 2013).

Os formadores de moldes são compostos anfifílicos, constituídos por duas partes que possuem propriedades diferentes: uma parte hidrofílica "grupo de cabeça" com uma forte afinidade para o solvente e uma "cauda" hidrofóbica, com menos afinidade para o solvente, podendo interagir com precursores inorgânicos para dirigir a formação da estrutura inorgânica (AMER et al., 2013). O grupo de cabeça pode transportar uma carga negativa ou positiva, dando agentes tensoativos aniônicos ou catiônicos, origem а moléculas na respectivamente. A presença destas superfície interrompe a energia de coesão da superfície e, assim, reduz a tensão superficial (ROSEN et al, 2012).

Ambos os conjuntos de surfactantes iônicos e não iônicos, bem como os co-polímeros têm sido aplicado na obtenção da hidroxiapatita porosa (ZENG *et al.*, 2014). Alguns dos principais

surfactantes câtionicos são brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) e o cloreto de tetradeciltrimetilamônio.

Os surfactantes aniônicos incluem sulfonatos de alquilbenzeno, dodecil sulfato de sódio (SDS), entre outros. Os exemplos mais comuns de surfactantes não iônicos são Pluronic P 123, F 127. Além destes, existem outros tipos de surfactante, os anfotéricos ou zwitteriônicos, Betaínas dodecilo e laurilo betaínas são exemplos comuns (LIN *et al.*, 2013).

Nanopartículas de hidroxiapatitas mesoporosas tem sido intensamente investigadas como potencial veículo em sistemas de carregamento e liberação de uma variedade de substâncias tais como: agentes farmacêuticos, fator do crescimento, peptídeos, proteínas, uma vez que não apresentam toxidade, possuem biocompatibilidade, são osteocondutivas e não inflamatórias (WU e CHANG, 2012; GAO *et al.*, 2012). Essas biocerâmicas porosas já estão bem estabelecidos como carregadores de fármacos e como implantes ósseos, já que eles tem um histórico comprovado de biosegurança e biocompatível (AGHAEI *et al.*, 2014).

Nestes materiais podem ser feitas várias substituições para modificar a sua carga superficial, ou seja, sua superfície pode ser funcionalizadas, e nesse sentido, a porosidade facilita a incorporação de grupos funcionais (PRAMANIK *et al.*, 2012). Com efeito, a interação entre a superfície HA e moléculas está relacionada com as propriedades de superfície (grupos funcionais de superfície, acidez e basicidade, carga superficial, hidrofilicidade e porosidade). A reatividade tanto da superfície como dos canais da estrutura está relacionada com presença da espécie H⁺ (PRAMANIK et al., 2012; WU e CHANG, 2012).

Das várias técnicas utilizadas para produzir a HA, os métodos mais pesquisados para a hidroxiapatita mesoporosa inclui o método de co-precipitação (ZENG *et al.*, 2014), sol-gel, o método

hidrotérmico e o processo de microemulsão (POH *et al*., 2014; PRAMANIK e IMAE, 2012).

Com base na literatura, a maior parte dos fosfatos de cálcio mesoporosos apresentam área de superfície de 20-60 m² g⁻¹, (ZENG *et al.*, 2014; YE *et al.*, 2012), o que se indica que existe um desafio da obtenção de sólido com elevada área superficial concomitante com diâmetro de poros maiores que 6 nm. Portanto, uma série de estudos foi dedicada a melhoria do diâmetro dos poros de HA mesoporosa (ABDALLA *et al.*, 2014).

Em nosso grupo de pesquisa, Fernandes, (2011) sintetizou hidroxiapatita mesoporosa a partir de diversos surfactantes como CTAB e SDS, em que obteve HA com área superficial de 5 – 98 m² g⁻¹ e utilizou este suporte para incorporar penicilina. Silva (2010), utilizando caseína como direcionador de poro conseguiu área de 106 m²g⁻¹ aplicando em adsorção de SBA.

Ibrahim *et al,* (2013) obtiveram HA mesoporosa com área de superficial de 35,3 – 212,4 m²g⁻¹ com diâmetro de 8,5 -16,8 nm. Guo *et al,* (2013) adsorveram o fármaco gentamicina na HA com área de superfície de 8,1 -35,1 m² g⁻¹ e distribuição de poros de 4,5 -14 nm, obtida com o surfactante CTAB. Zeng *et al,* (2014) obtiveram HA mesoporosa com área superficial variando de 32,9 – 94,8 m² g⁻¹ com diâmetro médio de poro de 5,5 -27 nm.

O tamanho de poro depende basicamente do surfactante empregado na síntese, mas também de outros parâmetros do processo de obtenção de forma que vários métodos têm sido desenvolvidos para controlar o tamanho de poro, visando aprimorar a aplicação final do material como é o caso do carregamento e liberação de fármacos (VALLET-REGÍ, 2011).

2.1.4 A caseína

As investigações se concentram cada vez mais em determinar as propriedades de compostos naturais que são de superfície ativa e auto-organizadas em estruturas micelares (HOLLAND *et al.*, 2011; KESSLER *et al.*, 2014). Exemplos de ocorrência natural de materiais ativos de superfície são as caseínas, que são a principal fonte de proteína no leite. Pode ser obtida a partir do leite por precipitação na presença de um ácido a um pH de 4,6 (SOEJIMA *et al.*, 2011).

Caseínas consistem de várias proteínas sendo as quatro principais formas as1-, as2, β - e κ -caseína, (na razão de 4:1:4:1, respectivamente), apresentando massa molecular como sendo as1: M = 23.000 (~38,49%), as2: M = 25.000 (~ 10,06%), β : M = 24.000 (~ 38,74%), k-caseína: M = 19.000 (~ 12,57%). Todas fazem parte da família da fosfoproteínas (ROCHELLE *et al.*, 2010; SANGEETHA e PHILIP, 2012), cuja função básica no caso da caseína no leite é o transporte dos componentes cálcio, fosfato e proteínas da glândula mamária.

As unidades estruturais de proteínas são aminoácidos que têm diferentes hidrofobicidades. Quando os aminoácidos com hidrofobicidades semelhantes estão dispostos sequencialmente na cadeia, blocos hidrofílicos ou hidrofóbicos distintos são formados (LIVNEY, 2010; SEMO *et al.,* 2007). Os resíduos hidrófobos e hidrófilos de aminoácidos podem, por conseguinte, facilmente se moldarem em micelas esféricas.

A proteína as1-caseína é um polímero de tribloco com duas extremidades hidrofóbicas e um centro hidrófilo (PORTNAYA *et al.*, 2011), enquanto que β -caseína, uma proteína anfifílica, apresenta-se como um polímero dibloco, em que a região C-terminal tem caracteristica hidrofóbica e as propriedades hidrófilas se concentra no N-terminal e, por conseguinte, atua como uma molécula ativa à superfície (SHAPIRA et al., 2010). A adição de cálcio (Ca²⁺) para

soluções β -caseína neutraliza a carga negativa existente e pode conduzir a um aumento nas interações hidrofóbicas, resultando na agregação de β -caseína e a formação de micelas (DAUPHAS *et al.*, 2008).

As micelas da caseína são relativamente grandes agregados destas proteínas, juntamente com fostato de cálcio e pequenas quantidades de citrato, com diâmetros entre 6 e 150 nm (HORNE, 2003). As micelas são hidratadas e sua estrutura é altamente porosa, apresentando estabilidade derivada da molécula caseína-κ. As interações hidrofóbicas e as ligações de fosfato de cálcio mantêm estas micelas juntas. Estas proteínas são ricas em prolina, o que formações de algumas conformações micelares permite as energeticamente favoráveis em solução (SHAPIRA et al., 2010). Apresentam baixa solubilidade para valores de pH entre 4,6 e 4,8, onde ocorre o seu ponto isoelétrico, sendo ainda moderadamente solúvel em água e bastante solúvel guando é adicionada a uma base (ELZOGHBY et al., 2011).

A estrutura molecular da a- e β -caseína esta representada na Figura 2.6.

Figura 2.6 Estrutura molecular da α- e β-caseína (SZYK-WARSZYNSKA *et al.*, 2009).



 α – Caseína

β – Caseína

A caseína apresenta-se como um bio-surfactante, por não apresentar descendência tóxica, como a maioria dos direcionadores, sendo uma proteína presente no sistema biológico humano.

2.1.5 Hidroxiapatita mesoporosa como sistema de liberação controlada de fármaco

Nas últimas três décadas pode ser observado um rápido crescimento na busca de novos sistemas de liberação de fármacos (WANG *et al.*, 2013). Os materiais naturais e sintéticos, incluindo fosfatos de cálcio, sílica inorgânica, bem como polímeros orgânicos tem sido estudados como substratos para o transporte de agentes terapêuticos (GINEBRA *et al.*, 2012).

A liberação controlada de fármacos funciona como uma ferramenta essencial para melhorar as terapias atuais, mostrando-se como um campo em constante evolução de materiais biomédicos (ARCOS e VALLET-REGÍ, 2013). Os sistemas de liberação controlada de fármacos devem ser capazes de entregar o agente bioativo precisamente no local alvo, a uma taxa específica. Geralmente, estes mantêm a concentração do fármaco nos locais exatos do corpo dentro de intervalo de tempo ótimo e abaixo do limite de toxicidade, o que melhora a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade e, por conseguinte, diminui os efeitos colaterais, trazendo mais conforto para o paciente, uma vez que o uso destes sistemas permite a redução da frequência de dosagem de um medicamento (CICUÉNDEZ *et al.*, 2013).

Outro aspecto relevante diz respeito ao problema específico da administração de fármacos, que é a redução da atividade do fármaco antes de alcançar o tecido alvo, devido à sua degradação previa (AGHAEI *et al.*, 2014). Nesse sentido, esse efeito é minimizado em sistemas de liberação controlada.

Desde os trabalhos de Vallet-Regí et al, em 2001, utilizando MCM-41 como um novo sistema de liberação de fármacos, diversos estudos têm relatado a utilização hidroxiapatita mesoporosa como carreadora de fármacos. Dentro deste contexto, as hidroxiapatitas mesoporosas tem sido amplamente empregadas como matrizes eficazes para a encapsulação e liberação controlada de fármacos, proteínas e outras moléculas biologicamente ativas, devido à sua semelhança com o tecido ósseo, as suas estruturas mesoporosas estáveis, bem como as propriedades superficiais, além da biocompatibilidade, osteocondutividade e caráter não inflamatório (COLILLA e VALLET-REGÍ, 2011; WANG et al., 2013).

Diversas estratégias têm sido aplicadas para encapsular agentes terapêuticos, podendo fármaco ser misturado tanto à fase líquida, quanto à fase sólida. Em geral, os fármacos são aprisionados pelo método de impregnação (SMITH et al., 2012; HUANG et al., metodologia 2014). Esta envolve а imersão dos materiais mesoporosos livre de surfactantes em uma solução altamente concentrada de fármaco, seguida de uma secagem. Este método é considerado vantajoso, devido à sua simplicidade e eficiência, no entanto, apresenta limitações, devido ao equilíbrio distribuições e a possível agregação do fármaco fora do material (DONGDONG et al., 2014; MANZANO E VALLET-REGÍ, 2012).

Os principais fatores que podem influenciar o carregamento e o perfil de liberação da molécula hospedada são a natureza da interação química hospedeiro-hóspede, a dimensão dos poros da matriz, estrutura e a área da superfície, os grupos funcionais presentes ou ausentes (CAO *et al.*, 2010; VALLET-REGÍ *et al.*, 2010). Em relação ao efeito do diâmetro dos poros, considera-se que quanto menor o tamanho dos poros maior a limitação ao carregamento e liberação de moléculas de fármaco, influenciada também pela área de superfície. Alguns destes parâmetros são ilustrados na Figura 2.7.

Figura 2.7 - Parâmetros que governam a capacidade de carregamento de moléculas biologicamente ativas. Adaptado de (VALLET-REGÍ, 2010).



A literatuta apresenta hidroxiapatita como sistema de carregamento e liberação para diversos fármacos como exemplificado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Alguns sistemas de liberação de fármacos de diversos fosfatos de cálcio.

Sistema	Fármaco	Quantidade adsorvida/liberação (%, t)	Referências
Compósito Hidroxiapatita e MCM de área 658 m ² g ⁻¹ com poro de 2,78 nm	Ibuprofeno	1000 mgg ⁻¹ / (98%, 25 dias)	Aghaei <i>et al</i> , (2014)
Hidroxiapatita com diâmetro de poro entre 35,2 - 146,4 nm	Ibuprofeno	200 mmol l ⁻¹ / (50% após 1 h, 95,6% 24 h)	Oner <i>et al</i> , (2011)
Hidroxiapatita de área 22,63 m² g ⁻¹ com poro de 10,18 nm	Aletronato	302 mgg⁻¹/ (76,9%, 72 h)	Shen <i>et al</i> , (2014)
Hidroxiapatita	Gencitabina	400 mgg⁻¹/ (65%,1 h e 89,7 %, 24 h)	Betsiou <i>et al,</i> (2012)
Hidroxiapatita de área 74,4 m ² g ⁻¹ com volume de poro de 0,37 m ² g ⁻¹	Ibuprofeno	(50,5%, 3 h e 94%, 12 h)	Zang <i>et al</i> , (2011)
Hidroxiapatita de área 46,5 m² g ⁻¹	Cloridrato de vancomicina	850 mgg ⁻¹ / (75,2%, 144 h)	Wang <i>et al,</i> (2013)

2.1.6 Cinética de liberação do fármaco

Existem vários métodos na literatura que tentam explicar a cinética de liberação em materiais porosos, contudo a maioria dos trabalhos com HA mesoporosa considera que a liberação é controlada pela difusão e que a taxa de velocidade de degradação do sólido é bem menor que a velocidade de liberação do fármaco (SHEN *et al.*, 2014; GINEBRA *et al.*, 2012).

Sendo assim a cinética de liberação é ser descrita por meio do método de Higuchi, que apresenta a liberação de um fármaco a partir de uma matriz insolúvel nas condições de pH do plasma. Este é baseado na lei de Fick, (GINEBRA *et al.,* 2012) onde a liberação acontece em camadas, sendo a camada da superfície inicialmente toda liberada, seguindo-se da difusão das camadas seguintes. A equação de Higuchi descrita na Equação 2.1.

$$q_t = K_H t^{\frac{1}{2}}$$
 (2.1)

Em que, q_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo te $k_{\rm H}$ representa a constante da taxa de liberação do modelo de Higuchi.

Outras metodologias, como a difusão não-Fickiana, é empregada com maior frequência, em relação aos sistemas Korsmeyer-Peppas, para os estudos de liberação com a matriz de fosfatos de cálcio (GINEBRA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013). O modelo Korsmeyer-Peppas esta representado pela Equação 2.2.

$$M_t / M_{\infty} = K t^n$$
 (2.2)

Onde: M_t e M_{∞} são as massas acumulativas do fármaco liberadas em um tempo t e em um tempo infinito, respectivamente. K

é a constante de proporcionalidade e n indica o mecanismo de liberação.

2.2 Ibuprofeno

O ibuprofeno, ácido 2- [4 - (2-metilpropil) fenil] propanóico, com fórmula moléculas $C_{13}H_{18}O_2$ é um dos compostos farmacêuticos com grande importância médica e comercial (KIM *et al.*, 2014). Faz parte da classe dos analgésicos não esteróides, com propriedades, antipiréticas e ações anti-inflamatórias (BAUM et al., 1985) tem sido estudado como modelo de fármaco para entrega controlada de drogas devido à sua semi-vida biológica curta, e excelente atividade farmacológica, e apresentar tamanho de aproximadamente de 1,0 x 0,6 nm (ZHU *et al.*, 2013).

O ibuprofeno foi sintetizado pela primeira vez em 1961 pelo Dr. Stewart Admas. Atualmente ele é usado por milhões de consumidores para tratar doenças relacionadas ao sistema ósseo. Além de ser indicado para tratar inflamações, não ultrapassando o limite de dosagem diária de 3.000 mg em casos graves (GINEBRA *et al.,* 2012; LIU *et al.,* 2013).

Este fármaco apresenta peso molecular 206 g mol⁻¹ com ponto de fusão entre 75-350 K e pontos de ebulição de 430 K (ABIOVE *et al.,* 2014). Apresenta alta permeabilidade e é solúvel em hexano, etanol, octanol, dimetil sulfóxido e clorofórmio (VIEIRA *et al.,* 2013).

O grupo carboxilico presente na estrutura do fármaco é relatado como provedor das interações entre o mesmo e os materias, proporcionando a existência de ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas disponíveis no material (AGHAEI *et al.*, 2014; ONER *et al.*, 2011).

Capítulo 3

Metodologia

3. Metodologia experimental

3.1 Reagentes químicos

Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes, todos sem purificação prévia:

- Hidrogenofosfato de diamônio (MERCK, 99%) (NH₄)₂.HPO₄;
- Cloreto de cálcio (SIGMA ALDRICH, 95%) CaCl₂;
- Nitrato de cálcio tetrahidratado (VETEC, 98%) Ca(NO₃)₂.4H₂O;
- Hidróxido de sódio (VETEC, 97%) NaOH;
- Caseína (REAGEN);
- Nitrato de prata (MERK) AgNO₃;
- Hexano (FMAIA, P.A) C₆H₁₆
- Álcool etílico (CHEMCO, P.A) CH₃CH₂OH;
- Carbonato de sódio dihidratado (SIGMA-ALDRICH, 98%) -Na₂CO_{3.}2H₂O;
- Água deionizada, obtida através do deionizador Permution.
- Ibuprofeno (FRAGON) C₁₃H₁₈O₂ cuja estrutura está representada na Figura 3.1

Figura 3.1 – Estrutura química do ibuprofeno.



Ácido (p-2 metilpropril) fenil propanóico

3.2 Síntese de hidroxiapatita

A síntese da hidroxiapatita porosa foi realizada partindo de soluções de volumes iguais contendo 0,033 mol de hidrogeno fosfato de diamônio $(NH_4)_2HPO_4$ e 0,056 mol de cloreto de cálcio $(CaCl_2)$ numa razão molar Ca/P = 1,67, a pH 10.

Inicialmente foi preparada 250 cm³ de uma solução de caseína na proporção de 5 mg de caseína por cm³ de solução NaOH a 0,2 molar. Essa solução a pH 10 foi adicionada a um balão de fundo redondo de três bocas com capacidade de 1000 cm³ e agitada vigorosamente a velocidade de 1400 rpm por 1 h, a temperatura ambiente, onde observou-se a formação de uma suspensão espumosa, caracterizando a formação de micelas. Em seguida, sob agitação mecânica de 200 rpm adicionou-se simultaneamente, a vazão de 2 cm³ min⁻¹, 250 cm³ de da solução aquosa de cloreto de cálcio (0,056 mol) e de fosfato de amônio (0,033 mol) (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013; AMER *et al.*, 2013).

Após a completa adição dessas soluções, o precipitado formado foi envelhecido sob agitação a temperatura ambiente por 15 h. Em seguida, o sólido obtido foi filtrado e lavado com água deionizada até o teste de cloreto negativo. Finalmente, o produto HA1A, foi seco a 373 ± 10 K em estufa por 24 h e foi obtido um rendimento de 4 gramas. Após seco, o sólido foi calcinado a temperatura de 773 K por 6 h em atmosfera de oxigênio, com taxa de aquecimento 10 K min⁻¹ para a eliminação do surfactante. O sólido obtido após o tratamento térmico foi denominado HA1B. Para efeito de comparação foi realizada uma síntese controle da hidroxiapatita mantendo as mesmas condições sem o uso do surfactante. O sólido obtido obtido foi denominado HA1puro.

A síntese da matriz porosa com o precursor Ca(NO₃)₂ foi realizada utilizando o mesmo procedimento adotado na síntese com o cloreto de cálcio. Os sólidos obtidos foram denominados HA2A e HA2B após o tratamento térmico. Foi realizada a síntese controle sem

adição de surfactante obtendo o sólido denominado de HA2puro. Os sólidos obtidos estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Designações dos sólidos obtidos.

Sistema	Descrição	
HA1puro	Sólido obtido com o precursor $CaCl_2$ sem modificação com o surfactante.	
HA1A	Sólido obtido com o precursor CaCl ₂ e modificado com surfactante.	
HA1B	Sólido obtido com o precursor CaCl ₂ , modificado com surfactante e calcinado.	
HA2puro	Sólido obtido com o precursor $Ca(NO_3)_2$ sem modificação com o surfactante.	
HA2A	Sólido obtido com o precursor $Ca(NO_3)_2$ e modificado com surfactante.	
HA2B	Sólido obtido com o precursor $Ca(NO_3)_{2,}$ modificado com surfactante e calcinado.	

O fluxograma de obtenção e o sistema utilizado na síntese das matrizes estão demonstrados nas Figuras 3.2 e 3.3.

Figura 3.2- Fluxograma da obtenção das matrizes porosas.





Figura 3.3 - Sistema utilizado para síntese da hidroxiapatita porosa.

3.3 Ensaios de carregamento do fármaco ibuprofeno na matriz hidroxiapatita

Neste estudo 250,0 mg das matrizes HA1A e HA1pura foram suspensas em 100 cm³ das soluções preparadas com concentrações de 500 ppm e a 1000 ppm com os solventes e água, etanol e hexano. Para os ensaios realizados com o solvente água o fármaco foi previamente dissolvido em uma solução a 5% de carbonato de sódio. As soluções foram mecanicamente agitadas em incubadora a temperatura ambiente a 130 rpm durante 24 h. Os sólidos foram filtrados, lavados com os respectivos solventes e secos a 313 K.

O esquema realizado neste ensaio está representado na Figura 3.4 (ONER *et al.*, 2011; GINEBRA *et al.*, 2012; ARCOS e VALLET-REGÍ, 2013).

Figura 3.4 - Fluxograma do carregamento de ibuprofeno (IBU) na hidroxiapatita mesoporosa.



3.3.1 Efeito do tempo

A obtenção da isoterma de tempo para o carregamento do ibuprofeno foi realizada pelo método da batelada no qual as amostras de aproximadamente 50 mg do sólido foi adicionadas a 20,0 cm³ das soluções do fármaco nos solventes etanol e hexano com concentração de 500 ppm. As soluções foram mecanicamente agitadas a 130 rpm em um banho termostatizado a temperatura de 298 K por tempos

variados de 5, 10, 20, 30, 60, 120, 360 e 720 min. Após os tempos de contato, centrifugou-se as soluções a 5000 rpm por 10 min e os sobrenadantes foram diluídos para uma concentração de 50 ppm e quantificadas na região do ultra-violeta a um comprimento de onda de 264 nm. Os sólidos foram filtrados e lavados com os respectivos solventes de cada ensaio.

Por meio da quantificação do fármaco presente no sobrenadante, tornou possível determinar a quantidade carregada (q_t) por grama de hidroxiapatita através da diferença das quantidades de fármaco presentes na solução em concentração molar inicial (C_i) e após um tempo determinado (C_f) pela Equação 3.1.

$$q_t = \frac{(C_i - C_f)}{m} * V \tag{3.1}$$

Em que V representa o volume de solução do fármaco adicionado à matriz para ser adsorvido, no caso 20,0 cm³, m é a massa de hidroxiapatita, aproximadamente 50 mg, C_i e C_f representam as concentrações antes e depois da adsorção, respectivamente. O resultado final foi expresso em N_f (mg.g⁻¹).

Adotou-se o método de adição de padrão para a quantificação do fármaco. Este método é útil na análise de amostras complexas, nas quais a probabilidade de efeito de matriz sobre o processo de medida do sinal analítico é alta (SKOOG *et al.*, 2002), o que foi observado nos testes preliminares, onde a solução final após a interação matriz/fármaco estava apresentando efeito de matriz.

O método por adição de padrão (MAP) por partição da amostra consiste em adicionar quantidades conhecidas do analito às amostras, possibilitando a medição dos sinais analíticos em condições idênticas entre padrões e amostras (BADER, 1980). Assim, para cada ponto da isoterma de tempo ou da liberação, obteve-se a curva de adição de padrão, pela adição sucessiva de padrões a volumes fixos do

sobrenadante que foram todos diluídos para 50 ppm. Cada curva era composta por quatro pontos, todos de volume 10 cm³, preparados da seguinte forma:

1) Branco: 1,0 cm³ da amostra aferida em um balão volumétrico de 10,0 cm³ com o solvente.

2) Padrão 10: 1,0 cm³da amostra + 1,0 cm³ do padrão a 10 ppm do fármaco + 8,0 cm³do solvente.

3) Padrão 40: 1,0 cm³da amostra + 1,0 cm³do padrão a 40 ppm do fármaco + 8,0 cm³do solvente.

4) Padrão 70: 1,0 cm³da amostra + 1,0 cm³do padrão a 70 ppm do fármaco + 8,0 cm³do solvente.

5) Padrão 100: 1,0 cm³da amostra + 1,0 cm³ do padrão a 100 ppm do fármaco + 8,0 cm³do solvente.

O procedimento do método por adição de padrão pode ser resumido na Figura 3.5.

Figura 3.5 – Representação do procedimento de implementação do MAP por partição da amostra.



3.3.2 Ensaios de liberação do ibuprofeno no fluido corporal simulado (SBF)

Primeiramente foi realizado o carregamento do fármaco ibuprofeno utilizando 500,0 mg da matriz HA1B, que foi suspensa em 200 cm³ de uma solução alcoólica de fármaco de 500 ppm. As suspensões foram mecanicamente agitadas, durante o tempo previamente estabelecido de 120 min a 298 K. Subsequentemente foi retirada uma alíquota do sobrenadante a qual foi centrifugada e posteriormente diluída para adição de padrão por partição, onde a quantificação do fármaco remanescente que foram quantificadas por espectroscopia de UV/Vis, como descrito no item 3.3.1. O sólido foi separado por filtração e lavado com aproximadamente 50 cm³ do solvente e seco à 313 K.

Os ensaios de liberação foram então realizados em erlenmeyer de 500,0 cm³, onde 200,0 mg da hidroxiapatita com o fármaco carregado na etapa anterior, foi posta em contato com 300,0 cm³ da solução aquosa do fluído simulado corpóreo (SBF), a pH 7,4 o qual tenta imitar o meio fisiológico. A suspensão foi então mecanicamente agitada a 310 K por 120 h. Durante este período, alíquotas de 5 cm³ foram removidas e o mesmo volume foi reposto com a solução de SBF. Os intervalos em horas avaliados foram 0,25; 0,75; 1,0; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 10,5; 15; 24; 31; 38; 51; 60; 72; 82; 96; 107 e 120 horas, totalizando 19 pontos. Deste modo, foi possível determinar a porcentagem de fármaco liberado pelo tempo avaliado, considerando a concentração remanescente da etapa anterior.

A solução do fluido corporal simulado (SBF), correspondente ao plasma sanguíneo humano, que foi preparada pela dissolução de NaCl (7,996 g), KCl (0,224 g), MgCl₂·6H₂O (0,305 g), NaHCO₃ (0,350 g), CaCl₂·6H₂O (0,278 g), Na₂SO₄ (0,071 g), K₂HPO4.3H₂O (0,228 g) e NH₂C(CH₂OH) (6,057 g) em 1 dm³ de água deionizada (ONER e UYSAL, 2013).

3.4 Técnicas de caracterização

3.4.1 Difração de raios X (DRX)

As amostras foram analisadas pelo difratrômetro de raios X modelo XRD-6000, da SHIMADZU. As amostras foram previamente peneirados a 200 mesh, em seguida compactados em um porta amostra e colocado no equipamento onde se utilizou potência de 2 kVA, voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA. Foram feitas varreduras no intervalo de 20 entre 5 e 60°, com um passo de 0,02° e velocidade de 2° min⁻¹, utilizando como fonte de radiação CuK_a λ =1,5406 Å.

O refinamento dos parâmetros de rede da célula unitária para todas as amostras foi realizado através do Programa Rede 93, considerando seis picos de difração.

3.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

As amostras foram analisadas em um equipamento IR PRESTIGE – 21, da marca SHIMADZU. O método utilizado foi o de pastilha de KBr, mantendo a proporção de 1 mg da amostra/100 mg de KBr, para maior comparação entre as intensidades dos picos. A varredura foi realizada no intervalo de 4000-400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e número de acumulações de 30 scans. A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi utilizada para identificar as unidades estruturais dos materiais.

3.4.3 Medidas de adsorção/dessorção de N₂

As amostras receberam um tratamento a 523 K por 2 horas em um Belprep II, da BEL, com fluxo de N₂(g), para eliminação de impurezas adsorvidas na superfície. Em seguida as amostras foram analisadas em um instrumento de adsorção volumétrica BELSORP II, da BEL JAPAN, utilizando N₂(g) e padrão de He, em um Dewar contendo N₂(I). Os dados de volume adsorvido e dessorvido em várias pressões relativas foram utilizados para gerar informações sobre a área superficial, distribuição e tamanho médio de poros. As medidas foram calculadas baseadas nas teorias de Brunaer-Emmett-Teller (BET) (BRUNAUER *et al*, 1938). As análises de diâmetro e volume total de poros foram obtidas pelo método de Barret-Joyner-Halanda (BJH) (BARRET *et al*, 1951).

3.4.4 Análise termogravimétrica

As medidas termogravimétricas (TG) e análise térmica diferencial (DTA) dos materiais foram realizadas em um analisador térmico modelo DTG-60H da Shimadzu de modo a avaliar a evolução térmica. Para obtenção das curvas de TG/DTA foram utilizados, aproximadamente, 10 mg de cada sólido. A análise foi realizada em cadinhos de platina sob fluxo de 50 cm³/min⁻¹ no intervalo de temperatura de 300 a 1000 K, com razão de aquecimento de 0,16 K/ s⁻¹, em atmosfera de nitrogênio.

3.4.5 Análise elementar

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinados usando um analisador microelementar da Perkin-Elmer, modelo PE 2400. Esta análise foi importante para determinar a

efetividade da presença da molécula do fármaco no material inorgânico.

3.4.6 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura por detecção de elétrons secundários em um microscópio JEOL-300, onde as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e carbono por metalização em um instrumento de Plasma Science. A microscopia permite obter dados sobre a morfologia e tamanho das partículas formadas.

3.4.7 Espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)

As amostras foram analisadas em um espectrofotômetro UV-Vis 2550, da SHIMADZU, no modo transmitância, com tubos de quartzo como acessórios para líquidos. Utilizando o comprimento de onda de 264 nm para as amostras carregadas com fármaco.

Capítulo 4

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

No presente trabalho foram sintetizadas hidroxiapatitas com porosidade controlada, empregando caseína como agente direcionador de estrutura е foram realizados estudos de carregamento do fármaco ibuprofeno. Neste capítulo constam os resultados e discussão desta pesquisa, a qual foi divida em três caracterização dos sólidos sintetizados; partes: ensaio do carregamento do ibuprofeno e liberação controlada do fármaco no fluido SBF.

4.1 Caracterizações dos sólidos sintetizados

4.1.1 Difratometria de raios X (DRX)

A difratometria de raios X é uma técnica de avaliação de longo alcance, sendo um método essencial para a identificação de fases cristalinas presentes no sólido. A Figura 4.1 apresenta o difratograma de raios X para a hidroxiapatita pura, sintetizada pelo método de coprecipitação, cujos planos foram indexados de acordo com carta cristalográfica JCPDS 09-0432. De acordo com estes dados observase a formação de hidroxiapatita de boa cristalinidade e sem a presença de fases interferentes.

Figura 4.1-Difratograma de raios X da hidroxiapatita pura.



Na Figura 4.2 estão dispostos os difratogramas das hidroxiapatitas sintetizadas utilizando os sais de cloreto de cálcio e nitrato de cálcio, respectivamente, pelo método de co-precipitação, com e sem a utilização de caseína.

Figura 4.2 - Difratogramas de raios X das amostras (I) HA1puro (a), HA1A (b), HA1B (c) e (II) HA2puro (a), HA2A (b), HA2B (c)



Analisando os difratogramas apresentados na Figura 4.2, verifica-se que todos os sólidos sintetizados sem e com agente direcionador formaram materiais monofásicos com a única fase hidroxiapatita, com base na literatura (ELLIOTT, 1994) e com o auxílio da carta cristalográfica JCPDS 09-0432. A utilização do direcionador não modificou a fase hidroxiapatita formada, uma vez que não foi identificado o surgimento de nenhum novo pico referente a outras fases de fosfato de cálcio.

Os padrões de DRX das amostras antes e depois do tratamento térmico apresentaram conservação dos picos de difração, correspondendo ao padrão dos picos característicos de simetria hexagonal (grupo espacial *P63/m*), indicando que a fase das amostras de hidroxiapatita é de alta pureza (AMER *et al.*, 2013).

Os parâmetros de rede das amostras foram calculados utilizando o Programa Rede 93, considerando 6 picos de difração, cujos resultados encontram-se na Tabela 4.1.

O volume da célula unitária foi calculado a partir da Equação 4.1 (CULLITY, 1956).

$$V = \frac{\sqrt{3.a^2.c}}{2} = 0,866.a^2.c \tag{4.1}$$

Os dados obtidos indicaram que o uso do direcionador promoveu pequenas alterações nos parâmetros de rede e no volume da célula unitária, o que não alterou a fase hidroxiapatita, verificada em concordância com os dados da carta JCPDS 09-0432.

Sistemas	Parâmetr	os de rede	Vol. de célula
Sistemas	(Hexagonal)		unitária
	a (Å)	C(Å)	V (Å ³)
Hidroxiapatita-padrão	9,41	6,88	527,58
HA1puro	9,21	6,95	510,53
HA1A	9,40	6,88	526,46
HA1B	9,46	6,83	529,32
HA2pura	9,23	6,99	515,70
HA2A	9,61	6,82	545,44
HA2B	9,16	7,02	510,09

Tabela 4.1– Parâmetros de rede dos sistemas HA1puro, HA1A, HA1B e HA2puro, HA2A, HA2B.

A cristalinidade desses materiais foi interpretada a partir da largura a meia altura (FWHM) dos mesmos, que foram obtidas da deconvolução do pico referente ao plano (002) em valor de 20 de aproximadamente 25,85°, utilizando o programa Peak Fit. De acordo com os dados de FWHM, observa-se uma diminuição da cristalinidade após a interação com a caseína tanto para os materiais calcinados, quanto para os que não receberam este tratamento. Esta interação foi confirmada pela análise da área superficial, na qual se observou o aumento da área e a formação de mesoporos com uso do direcionador. Fernandes (2011) também observou que a utilização dos surfactantes brometo de hexa deciltrimetilamônio (CTAB), brometo de miristiltrimetilamônio (MTAB) e dodecilsulfato de sódio (SDS) provocou uma redução na cristalinidade da hidroxiapatita.

Neste trabalho observou-se que a calcinação a 773 K promoveu uma maior organização da rede cristalina dos materiais, com consequente aumento da cristalinidade, tanto para os sólidos sintetizados com cloreto de cálcio, quanto os sólidos com nitrato de cálcio. Pode-se observar que estes materiais calcinados apresentam uma área superficial um pouco menor, possivelmente devido à

coalescência de partículas após o tratamento térmico. A Tabela 4.2 apresenta esta relação.

Tabela 4.2– Relação entre área superficial e largura a meia altura dos sólidos sintetizados.

Sólido	FWHM	S _{BET} (m ² g ^{−1})
HA1puro	0,9566	52
HA1A	1,1700	114
HA1B	0,9580	90
HA2puro	1,1422	46
HA2A	1,6767	147
HA2B	1,2375	86

De modo geral, os materiais obtidos tanto pelos precursores cloreto, como nitrato, apresentaram cristalinidade conforme a ordem $HA_{puro} > HA_{após calcinado} > HA_{antes calcinação}$. Este comportamento é geralmente verificado quando se utiliza o tratamento térmico (SADRNEZHAAD *et al.*, 2013).

4.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Esta análise é importante, pois permite verificar os movimentos vibracionais dos grupos existentes nos materiais, que absorvem energia na região do infravermelho, indicando a obtenção da hidroxiapatita. A Figura 4.3 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras sintetizadas com cloreto de cálcio em (I) e sintetizadas com nitrato de cálcio em (II).

Figura 4.3 – Espectros na região do infravermelho dos sólidos (I) HA1puro (a), HA1A (b) e HA1B (c) e (II) HA2puro (a), HA2A (b) e H-2B (c) a 298K.



Nestes espectros, observam-se as absorbâncias características da deformação assimétrica do grupo PO₄³⁻ entre 1100 e 950 cm⁻¹ e em torno de 870 cm⁻¹, associado ao estiramento P-OH em HPO₄²⁻. A banda próxima a 600 cm⁻¹ é correspondente à deformação assimétrica da ligação P-O do grupo PO₄³⁻, já a absorção em 560 cm⁻¹ corresponde à deformação assimétrica da ligação P-O(H) do grupo HPO₄²⁻. Observa-se uma absorção em torno de 3500 cm⁻¹ atribuída às vibrações de estiramento de grupos OH, tanto da água quanto do fosfato e sua deformação aparece em torno de 640 cm⁻¹. A banda de deformação das moléculas de água aparece em 1650 cm⁻¹. Nos sólidos sintetizados com nitrato de cálcio observa-se que esta banda de água apresenta uma intensidade maior, sugerindo uma maior hidratação destes materiais (ELLIOTT, 1994; HAMMARI *et al.*, 2006; ARMED *et al.*, 2014).

Verifica-se algumas bandas de pequena intensidade na região de 2938 e 2853 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H e uma absorção em 1465 cm⁻¹, referente à deformação de grupos CH₂ (LIN-VIEN *et al.*, 1991). A presença destas absorções sugere a existência de resquícios do direcionador de estrutura, mesmo após o processo de extração (ZANG *et al.*, 2010; LIN-VIEN *et al.*; 1991). Nos sólidos HA1puro e HA2puro, sintetizados sem a caseína é possível verificar que essas bandas não aparecem. A banda na região de 1450 cm⁻¹ provavelmente é atribuída ao estiramento assimétrico e simétrico do NO do íons nitrato (LIN-VIEN *et al.*, 1991). A Tabela 4.3 apresenta um resumo das principais absorções observadas nos espectros de infravermelho para as hidroxiapatitas sintetizadas e as respectivas atribuições.

Região de Absorção (cm ⁻¹)	Atribuições
3700 -2500	v O-H de H ₂ O adsorvida e O-H de grupo OH
2938	v assimétrico do C-H (-CH ₂ -)
2853	v simétrico do C-H (-CH ₂ -)
1650	δ O-H de H ₂ O adsorvida
1465	v assimétrico e simétrico C-H
1450	v assimétrico e simétrico do NO
1100	vP-O do grupo PO ₄ ³⁻
1000	vP-O do grupo PO ₄ ³⁻
950	vP-O do grupo PO ₄ ³⁻
870	δ P-O(H) do grupo HPO ₄ ²⁻
640	δ O-H de grupo OH
600	δ P-O do grupo PO ₄ ³⁻
560	δ P-O(H) do grupo HPO ₄ ²⁻

Tabela 4.3 – Principais absorções na região do infravermelho dos materiais sintetizados.

4.1.3 Medidas de adsorção/dessorção de N₂

Os valores de área superficial em partículas sólidas têm sido usualmente obtidos pelo método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (BET). Este método utiliza dados referentes à adsorção de um gás versus à pressão relativa P/P₀, para originar isotermas de adsorção/dessorção e a partir do tratamento matemático obter informações importantes sobre a superfície e a porosidade do material. Sendo assim, esta análise é de suma importância para sistemas porosos, uma vez que determina as propriedades de adsorção do material.

De acordo com a isoterma de adsorção de N₂, visualizada na Figura 4.4, observa-se que as isotermas de todos os sólidos sintetizados apresentam características de isoterma do tipo II, de acordo com a classificação de Brunauer, Deming, Deming e Teller (BDDT), que associa a forma das isotermas de adsorção às dimensões e características dos poros presentes no sólido (KHALFAOUI et al., 2003; BRUNAUER et al., 1940). A isoterma do tipo II, conforme a IUPAC pode ser característica de materiais não porosos ou macroporosos (VILCHIS-GRANADOS et al., 2014). Contudo as isotermas das amostras HA1A e HA1B apresentam histerese em altas pressões parciais, em valores aproximadamente P/P_0 de 0,75 e 0,8, respectivamente, classificadas pela IUPAC, como sendo do tipo H3, indicando que estes materiais apresentam mesoporos em formato de cunha, cone e/ou placas paralelas.

É importante avaliar a histerese apresentada, pois esta resulta do mecanismo de condensação e evaporação do gás adsorvido e a existência desta indica que o material apresenta poros na ordem de micro, quando a histerese ocorre em pressões baixas e mesoporos, quando em pressões elevadas (McCUSKER *et al.*, 2001).

Zeng *et al.* (2014), Amer *et al.* (2013) e Dongdong *et al.* (2013), observaram este mesmo comportamento de isoterma em amostras de hidroxiapatita mesoporosa e as classificaram como tipo IV, típica de materiais mesoporosos, mesmo sem a identificação de patamar de saturação em pressões relativas altas. Ye *et al.* (2013) classificaram a curva de isoterma da hidroxiapatita mesoporosa obtida como do tipo II, contudo justifica ser mesoporosa por apresentar histerese tipo H3 e distribuição de tamanho de poros entre 3,17 e 5,8 nm. Guo *et al.* (2013) justificaram a estrutura mesoporosa da hidroxiapatita com área de 46,5 m²g⁻¹, indicando apresentar histerese tipo H3 e diâmetro de poro entre 5,4 e 12,2 nm.

Pela isoterma de adsorção de N₂ das Figuras 4.4 e 4.5 observase na isoterma dos sólidos HA1puro e HA2puro, um aumento inicial na quantidade de gás adsorvido para valores baixos de pressão relativa, e com o crescimento da pressão este crescimento se torna mais lento. Este comportamento pode ser esperado para hidroxiapatitas puras sem tratamento com o surfactante, onde a área superficial de BET é de aproximadamente 18 m² g⁻¹ (GRANADOS et al., 2013). Para os materiais sem modificação, o diâmetro médio de poros foi observado na faixa de 2 a 7 nm, com uma área superficial de 52 e 46 m² g⁻¹.

Figura 4.4 – Isotermas de adsorção/dessorção e distribuição de diâmetro de poros dos sólidos HA1puro, HA1A e HA1B.




Figura 4.5 – Isotermas de adsorção/dessorção e distribuição de diâmetro de poros dos materiais HA2puro, HA2A e HA2B.





A distribuição de tamanho de poro, calculada com base no modelo Barret, Joyner e Halenda (BJH) é um importante parâmetro para o estudo da estrutura porosa, já que está intimamente relacionada à área total do sólido. No detalhe mostrado na Figura 4.4, observa-se uma distribuição geral de diâmetros de poros variando entre aproximadamente 2 e 40 nm para os sólidos porosos. Para os sólidos HA1A e HA1B, verifica-se que a maior população de poros está disposta em uma faixa estreita entre 15 e 25 nm, indicando formação de mesoporos, levando em conta a classificação da IUPAC, em que poros com diâmetros de 2 a 50 nm estão na faixa de mesoporos (MECCUSKER *et al.*, 2001). Assim, corroborando com o estudo de histese em pressões elevadas, estes sólidos sintetizados caracterizam-se como materiais mesoporosos.

Para a matriz HA2A, verificou-se um diâmetro médio de poro de 9,7 nm, cujo valor é menor que o apresentado no sólido HA1A, que foi de 15,2 nm, preparada com o precusor cloreto, obdecendo as mesmas condições de síntese, conforme Tabela 4.4. O sólido HA2B diâmetro apresentou de poros maiores após calcinação, а apresentando um comportamento semelhante à matriz HA1B. Verificou-se que os materias sintetizados com cloreto apresentaram volumes de poros maiores para o sólido não calcinado, sendo de 0,30 cm³ g⁻¹ e para os materiais sintetizados com nitrato observou-se um volume de poro maior para a matriz calcinada HA2B, sendo de 0,33 $cm^{3} g^{-1}$.

É importante ressaltar que a possibilidade de controle da estrutura, como variação do tamanho de poros, é uma das características que tornam estes materiais atraentes como matrizes para dispositivos de liberação controlada de fármacos, visto que a quantidade de fármaco carregado dependente da área superficial específica e do diâmetro dos poros da matriz hospedeira. Assim, quanto maior a área de superfície e o tamanho dos poros, mais favorecido poderá ser o carregamento do fármaco na matriz (VALLET-REGI *et al.*, 2011).

59

Tabela 4.4 – Dados das propriedades texturais obtidos a partir das medidas de adsorção/dessorção de N_2 para os sólidos sintetizados, em que S_{BET} é a área obtida pelo método BET, Langmuir é a área, Vp e Dp são volume e diâmetro médio de poro.

Sólido	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	Langmuir (m ² g ⁻¹)	Vp (cm ³ g ⁻¹)	Dp (nm)
HA1puro	52	48	0,09	3,6
HA1A	114	98	0,30	15,2
HA1B	90	84	0,24	24,5
HA2puro	46	40	0,09	2,9
HA2A	147	105	0,29	9,7
HA2B	86	72	0,33	24,0

Analisando a Tabela 4.4 e as isotermas verifica-se que os sólidos obtidos utilizando caseína como surfactante apresentaram uma área superficial de BET entre 86 e 147 m² g⁻¹, cujos valores são considerados elevados, quando comparados a outros fosfatos de cálcio mesoporosos descritos na literatura. Por exemplo, Sun *et al.* (2014) relataram em seu estudo uma área de 60 m² g⁻¹ para hidroxiapatita porosa, Silva (2010) obteve uma variação de área de 54 - 106 m² g⁻¹, Fernandes (2011) observou áreas superficiais entre 5 - 98 m² g⁻¹ após a interação da hidroxiapatita com vários surfactantes.

Por meio da avaliação dos dados da Tabela 4.4 constatou-se que o tratamento térmico pós-síntese afetou os valores de área e diâmetro de poro, provocando uma maior contração da estrutura porosa, resultando em sólidos de menores áreas superficiais. Amer *et al*. (2013) também observaram a redução da área superficial de 87 m² g⁻¹ para 55 m² g⁻¹, após o tratamento térmico de 773 K durante 10 horas, justificando a redução da área de superfície específica pelo efeito do tratamento térmico sobre a rede de poros. Contudo, no presente trabalho observa-se que a distribuição de poros foi afetada positivamente, visto que a faixa de distribuição de poros no sólido HA1A encontra-se entre 15 e 25 nm e para o sólido HA1B, obtido após a calcinação, apresenta uma maior população de poros na faixa de 14 e 25 nm. Analisando a Tabela 4.4, nota-se um deslocamento do diâmetro médio de poros para valores maiores após a calcinação. Além disso, os volumes de poros sofreram variações pequenas com o tratamento térmico.

Pode-se verificar ainda que o material HA2A apesar de apresentar uma elevada área superficial, tem um valor médio de diâmetro de poro em torno de 9,2 nm, enquanto que a matriz HA1A apresentou elevada área superficial e um valor médio de diâmetro de poro de 15,2 nm.

4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para verificar a morfologia das hidroxiapatitas puras, não porosas e as mesoporosas foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura. Para isto, foram escolhidas apenas as amostras pura e porosa, sintetizadas com cloreto de cálcio, que estão representadas nas Figuras 4.6 e 4.7.

Observa-se que as partículas de hidroxiapatita apresentaram-se em aglomerados sem forma definida e de tamanhos irregulares. Ahmed *et al.* (2014) investigaram a influência do pH na morfologia da hidroxiapatita obtida pelo método de co-precipitação e também perceberam que em pH acima de 9 ocorre uma tendência a aglomeração das partículas. **Figura 4.6**- Microscopias eletrônicas de varredura para hidroxiapatita pura.



Figura 4.7- Microscopias eletrônicas de varredura para hidroxiapatita mesoporosa.



Verifica-se ainda certa rugosidade na superfície dos materiais sintetizados, principalmente dos sistemas porosos.

4.1.5 Reprodutibilidade das sínteses de HA porosa

Foram realizadas várias sínteses com a finalidade de verificar a reprodutibilidades dos resultados, uma vez que a literatura reporta a dificuldade de se obter materiais com faixa estreita de diâmetros de poros e elevada área superficial (ARCOS e VALLETT-REGÍ, 2013), o que é essencial para a aplicação em sistemas de carregamento e liberação controlada de fármacos.

Foi estudada a reprodução das propriedades de área superficial e do diâmetro de poro para os sólidos HA preparados com cloreto de cálcio, visto que este precursor resultou em materiais com uma melhor relação entre diâmetro de poro e área superficial.

Conforme mostrado na Figura 4.8, onde estão dispostos os difratogramas dos sólidos sintetizados, verifica-se em cada síntese a reprodução da estrutura hidroxiapatita monofásica em todos os sólidos sintetizados.

Figura 4.8 – Difratogramas de raios X das amostras HA1A referentes às sínteses I, II e III.



Na Figura 4.9 são apresentadas as isotermas de adsorção/dessorção de N₂ para os sólidos sintetizados, onde é observado o mesmo perfil indicado anteriormente, ou seja, isoterma do tipo II com histerese do tipo H3, o que resultou nos dados de área superficial apresentados na Tabela 4.5, cujo valor médio foi de 98 \pm 4 m² g⁻¹.

Figura 4.9 – Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e distribuição de tamanho para as amostras HA1A, referentes às sínteses I, II e III.



Tabela 4.5 - Dados das propriedades texturais obtidos a partir das medidas de adsorção/dessorção de N₂ para os sólidos mesoporos (precursor cloreto), em que S_{BET} e é a área obtida pelo método BET, Langmuir é a área, Vp e Dp são volume e diâmetro médio de poro.

Síntese	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	Langmuir (m ² g ⁻¹)	V _p (cm ³ g ⁻¹)	D _p (nm)
I	98	90	0,22	20
II	102	94	0,24	22
III	94	86	0,23	18

Em outras palavras, o baixo valor do desvio padrão apresentado indica a boa reprodutibilidade na síntese, tendo em vista que se encontra praticamente dentro do erro da técnica. Quanto às demais propriedades, um mesmo comportamento foi observado.

Este conjunto de dados confirmou, portanto, que a síntese da hidroxiapatita mesoporosa obtida neste trabalho apresentou boa reprodutibilidade, originando sólidos com características texturais de superfície, diâmetro e volume de poro, importantes para a sua aplicação em carregamento e liberação controlada de fármacos.

4.2 Ensaios de carregamento com ibuprofeno

4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O sólido obtido com o precursor cloreto de cálcio foi escolhido para a realização dos ensaios de carregamento levando em conta seus valores de diâmetro de poro, volume de poro e área superficial. A fim de investigar a capacidade de carregamento dos sólidos HA1A, HA1B e HA1puro foram realizados estudos com o ibuprofeno utilizando três solventes com polaridades diferentes, água, etanol e hexano.

Para verificar a interação do fármaco com as matrizes de hidroxiapatita foi realizada a caracterização destes sólidos através da técnica de espectroscopia na região do infravermelho, a qual foi aliada a análise elementar de carbono e nitrogênio e a termogravimetria. Na Figura 4.10 estão ilustrados os espectros na região do infravermelho para os sólidos carregados com o fármaco.

Figura 4.10 - Espectros na região do infravermelho do sólido HA1puro carregado com ibuprofeno nos solventes água (a), etanol (b) e hexano (c), em comparação com o sólido sem fármaco (d) a 298 K.



Verifica-se além das absorções referente à matriz hidroxiapatita, já mencionada no item 4.2, a presença de novas absorções nos sólidos, após o contato com o ibuprofeno, indicando a efetividade da incorporação do fármaco, cujas bandas estão presentes em todos os sólidos carregados com ibuprofeno, na região de 1550 cm⁻¹ e 1420 cm⁻¹.

As absorções em torno de 1620-1565 cm⁻¹, podem ser atribuídas a dissubstituição do anel aromático (LIN-VIEN *et al.*; 1991), presente na estrutura do fármaco, esta absorção pode ser difícil de observar pois pode estar sobreposta pela deformação de CH₂ e CH₃ e com o estiramento simétrico do grupo C=O. Observa-se em 1420 cm⁻¹ a deformação no plano do grupo C-OH, que é relatada na faixa de 1440-1395 cm⁻¹, conforme Lin-Vien *et al.* (1991). A banda de carbonila pode estar encoberta pela banda de água já existente no material em 1645 cm⁻¹, pois de acordo com Lin-Vien *et al.* (1991), a banda do grupo carbonila em ácido carboxílicos com anéis aromáticos condensados absorvem em torno de 1710 – 1660 cm⁻¹. Quando o efeito de ressonância é mais pronunciado que o efetivo indutivo a conjugação aumenta o caráter da ligação sigma, o que diminui suas constantes de força, resultando na diminuição das frequências de absorção da carbonila e da ligação dupla. A banda presente na frequência de 2950 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento assimétrico do C-H em grupo metila, presente na estrutura do fármaco.

Estas absorções mencionadas acima estão em concordância com o espectro do ibuprofeno disponível na literatura (ONER *et al.,* 2011).

Figura 4.11 – Espectros na região do infravermelho do sólido HA1A, carregado com ibuprofeno nos solventes água (a), etanol (b) e hexano (c) em comparação com sólido sem fármaco (d) a 298 K.



Figura 4.12 – Espectros na região do infravermelho do sólido HA1B, carregado com ibuprofeno nos solventes água (a), etanol (b) e hexano (c) em comparação com sólido sem fármaco (d) a 298 K.



Em geral as absorções provenientes da hidroxiapatita se mantiveram tanto no sólido HA1A como no HA1B, após o carregamento com o fármaco, entretanto observa-se o alargamento da banda do estiramento O-H em aproximadamente 3500-3300 cm⁻¹, que é proveniente da ligação de hidrogênio, com o aumento da polaridade do solvente, uma vez que as hidroxilas do etanol e da água podem contribuir com esse aumento. A absorção em 1640 cm⁻¹ é característica da deformação angular da ligação OH da água, que apresenta-se mais acentuada após a interação com o fármaco ibuprofeno.

Algumas bandas de pequena intensidade foram observadas nos sólidos modificados com surfactantes antes da interação com o medicamento, na frequência de 2960 cm⁻¹, relativa ao estiramento C-H sp³ e outra referente à deformação dos grupos metilênicos em 1460 cm⁻¹, onde estas sugerem a existência de resquícios do direcionador de estrutura, caseína, após o processo de extração.

A absorção do estiramento C-O aparece normalmente para álcool primário em torno de 1058 cm⁻¹, mas pode ser movida para frequências mais baixas devido à presença da insaturação, assim esta absorção pode estar encoberta pela banda do grupo PO_4^{-3} em 1033 cm⁻¹. As absorções na região de 3082 cm⁻¹ e 2870 cm⁻¹ estão presentes no espectro do ibuprofeno, indicando a interação do fármaco com a matriz.

Oner *et al.* (2011) sugerem a interação de ibuprofeno na HA após observarem bandas características em 3435 cm⁻¹ e 1635 cm⁻¹, que atribuíram a existência de água e as absorções em 1462, 2924 e 2955 cm⁻¹ dos estiramentos C-H e observaram também a vibração em 1416 cm⁻¹, que atribuíram a O-H, o que corrobora com as Figuras 4.11 e 4.12, que mostram os espectros dos sólidos incorporados com o fármaco. Dongdong *et al.* (2013) atribuíram a absorção em 1564 cm⁻¹ à vibração de estiramento assimétrica do grupo COOH, sugerindo que esta absorção indica a interação do ibuprofeno com a matriz, utilizando hexano como solvente.

4.2.2 Análise elementar

Na Tabela 4.6 verificam-se as percentagens de Carbono e Nitrogênio presentes nas matrizes de hidroxiapatita antes após a interação com o ibuprofeno.

Para efeito de controle foi realizada a análise da amostra HA1B, calcinada antes do carregamento com o fármaco, a qual apresentou 0,42% de carbono. Analisando a Tabela 4.6 verifica-se que após a interação com o ibuprofeno, a percentagem de carbono para esta amostra aumenta para 0,82% (0,68 mmol g⁻¹), 2,33% (1,98 mmol g⁻¹) e 3,89% (3,25 mmol g⁻¹), quando em contato por 24 h com soluções a 500 e 1000 ppm de ibuprofeno nos solventes água, etanol e hexano, respectivamente.

Tabela 4.6 – Dados de análise elementar de carbono e nitrogênio para as amostras HA1puro, HA1A e HA1B carregados com ibuprofeno nos solventes água, etanol e hexano.

	Água			Etanol			Hexano					
Solido	% C	mmol g⁻¹	% N	mmol g⁻¹	% C	mmol g⁻¹	% N	mmol g⁻¹	% C	mmol g ⁻¹	% N	mmol g⁻¹
HA1puro 1000ppm	1,22	1,02	0,08	0,06	0,74	0,62	0,08	0,06	3,73	3,11	0,11	0,08
HA1A 500 ppm	4,05	3,37	0,82	0,58	5,88	4,90	1,95	1,39	9,36	7,80	1,96	1,42
HA1A 1000 ppm	3,57	2,97	0,61	0,44	6,00	5,00	1,46	1,04	9,69	8,07	1,96	1,42
HA1B 500 ppm	0,82	0,68	-	-	2,38	1,98	-	-	3,89	3,25	-	-

Analisando a Tabela 4.6 verificou-se uma pequena diferença na percentagem de carbono para a matriz HA1A carregada na concentração de 500 ppm e 1000 ppm, constatando que a concentrações baixas é possível carregar quantidades consideráveis de fármaco.

Após a interação da matriz mesoporosa não calcinada HA1A com o fármaco, as quantidades incorporadas de ibuprofeno foram de 3,37; 4,90 e 7,80 mmol g⁻¹ nos solventes água, etanol e hexano, respectivamente. Estes dados foram superiores aos verificados para a matriz sintetizada sem o direcionador HA1puro, os quais foram de 1,02; 0,62 e 3,11 mmol g⁻¹ para os solventes água, etanol e hexano, respectivamente.

A incorporação do fármaco na matriz mesoporosa é facilitada pela existência dos poros, visto que isto é possível uma vez que o diâmetro médio dos poros obtidos é de aproximadamente 15 nm e o volume de aproximadamente 0,29 cm³ g⁻¹ para este sólido e o tamanho do ibuprofeno é de aproximadamente 1,06 nm por 0,6 nm. Além disso, a presença de poros colabora com carregamento do fármaco, uma vez que dentro dos poros existem grupos OH disponíveis para interagir com o grupo carboxílico do ibuprofeno, além dos grupos OH presentes em toda a superfície da matriz (ARCOS e VALLET- REGÍ, 2013; ABIOYTE *et al.*, 2014).

A interação dentro dos poros e na superfície ocorre eficazmente, uma vez que todos os sólidos foram lavados com 50 cm³ dos seus respectivos solvente para remover qualquer excesso de fármaco. Além disso, este ensaio foi realizado em duplicata. Assim sugere-se que ocorreu uma interação entre o ibuprofeno e a hidroxiapatita.

Abioyte *et al.* (2014), Oner *et al.* (2010), Dongdong *et al.* (2013) e Yang *et al.* (2008) relatam que a interação do ibuprofeno com a hidroxiapatita é regulada principalmente pela interação de ligações de hidrogênio entre adsorbato, adsorvente e do

71

solvente. Onde os principais locais de interação são o interior dos poros e a superfície, a partir da formação da ligação de hidrogênio entre os grupos carboxílicos do ibuprofeno com os grupos OH da matriz de fosfato de cálcio.

As moléculas do fármaco podem ocupar diferentes posições no interior dos poros, segundo Arcos e Vallet-Regí (2013), como mostrado na Figura 4.13.

Figura 4.13 - Possíveis localizações das moléculas de fármacos nos mesoporos de um material bioativo. Adaptado (ARCOS e VALLET-REGÍ, 2013).



Os principais locais de interação do fármaco são:

(1) a janela dos poros;

(2) no interior do poro por meio de interações de ligações de hidrogênio;

(3) no interior do poro com interações entre fármaco e fármaco;

(4) por adsorção e ligação de hidrogênio na parte exterior do material.

A capacidade de carregamento e a cinética de liberação do fármaco são dependentes das características texturais como área superficial, volume e diâmetro de poro adequado, como também da interação do fármaco com o material. (ARCOS e VALLET- REGÍ 2013).

Com os dados da análise elementar, sugere-se que a matriz mesoporosa obtida neste estudo pode ser utilizada em estudos de carregamento e liberação de fármacos.

4.2.3 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas e as derivadas dos materiais antes e após a interação com o fármaco estão apresentadas na Figura 4.14. A Tabela 4.7 apresenta os dados da análise termogravimétrica para estes sólidos.

Figura 4.14- Curvas termogravimétricas para o sólido HA1A, carregado com ibuprofeno nos solventes água (a), etanol (b) e hexano (c) em comparação com sólido sem fármaco (d) a 298 K.



Amostra	Perda de massa (%)	Faixa de T (K)
HA1A	4,7 3,7 2,1	309-472 472-790 790-1064
HA1A-água	5,0 7,1 3,8	309-472 472-790 790-1064
HA1A-etanol	6,2 9,4 4,5	309-472 472-790 790-1064
HA1A-hexano	5,8 12,9 5,8	309-472 472-790 790-1064

Tabela 4.7- Dados da análise termogravimétrica para o sólido HA1Acarregado com ibuprofeno nos solventes água, etanol e hexano.

Observa-se pela Tabela 4.7 e na Figura 4.14 que a hidroxiapatita mesoporosa apresenta três etapas de perda de massa. Uma primeira etapa de 309 a 472 K foi atribuída à evaporação de água adsorvida na superfície e nos poros do material, cuja porcentagem da perda de massa nesta etapa é de aproximadamente 4,7%. A segunda etapa de 472 a 790 K é atribuída à liberação dos grupos OH⁻ dos cristais de hidroxiapatita e do direcionador de poro caseína, na qual verifica-se um percentual da perda de massa de aproximadamente 3,7%. Um terceiro estágio de perda de 2,1% entre 790 - 1064 K, que foi relacionada à decomposição da hidroxiapatita e última etapa, acima de 1493 K, não visualizada na análise está relacionada à decomposição da hidroxiapatita em trifosfato de cálcio. ADOLFSSON *et al*, (1999) estabeleceram as reações de decomposição

da hidroxiapatita em duas etapas de perda de massa, conforme Equações (4) e (5):

 $Ca_{10}(PO_{4})_{6}(OH)_{2} \rightarrow Ca_{10}(PO_{4})_{6}(OH)_{2-2x}O_{x} + xH_{2}O \quad (T>1073 \text{ K}) (4)$ $Ca_{10}(PO_{4})_{6}(OH)_{2-2x}O_{x} \rightarrow 3Ca_{3}(PO_{4})_{2} + CaO + (1-x)H_{2}O \quad (T>1493K)$ (5)

A hidroxiapatita mesoporosa por possuir elevada área superficial especifica, apresenta grupos OH, tanto na superfície como no interior dos poros, o que lhes confere alto índice de moléculas de água adsorvida nestes materiais na decomposição térmica.

Observa-se que os sólidos carregados com ibuprofeno a partir das soluções com os solventes água, etanol e hexano apresentaram as mesmas etapas de perdas. Contudo, avaliando os valores da Tabela 4.7 e as curvas termogravimétricas na Figura 4.14, nota-se que a interação com o ibuprofeno provoca um aumento do percentual de perda de massa.

Os valores da primeira etapa de perda para os sólidos carregados com ibuprofeno foram de 5,0%; 6,2% e 5,8% nos solventes água, etanol e hexano, respectivamente. Esta perda foi atribuída à saída de água adsorvida no material.

O segundo evento de perda ocorre no intervalo de 472-790 K, que foi atribuído à eliminação dos grupos OH⁻ e do direcionador e do ibuprofeno adsorvido. Verifica-se que com a diminuição da polaridade do solvente a porcentagem de perda de massa é acentuada, sendo de 7,1%; 9,4% e 12,9% para os sólidos carregados com ibuprofeno com os solventes água, etanol e hexano, respectivamente. Observa-se que a quantidade de fármaco incorporado na hidroxiapatita aumenta quando a polaridade do solvente diminui, este resultado corrobora com a análise elementar.

Uma terceira perda de massa com valores de 3,8%, 4,4% e 5,8% foi observada no intervalo de 790 a 1064 K, sendo atribuída à

eliminação de grupos OH⁻ da superfície da hidroxiapatita e à eliminação das moléculas direcionadoras e de fármaco remanescentes.

4.2.4 Efeito do tempo

O estudo do tempo é importante para otimizar o carregamento do fármaco na hidroxiapatita. Nesse sentido, foi investigado o melhor tempo de carregamento para o etanol e o hexano, excluindo-se a água como solvente, pois o estudo anterior sugeriu uma pequena incorporação do fármaco na matriz utilizando este solvente.

A capacidade de carregamento do anti-inflamatório pela hidroxiapatita mesoporosa HA1B em solução de ibuprofeno em hexano e em álcool foi determinada por UV-VIS, levando-se em consideração o efeito do tempo de contato, em cujo ensaio a concentração do fármaco foi fixada em 500 ppm e o tempo da reação foi variado em intervalos pré-estabelecidos até completar 12 h, quando foi utilizado o solvente hexano e 6 h para o solvente etanol.

Pela avaliação das isotermas da Figura 4.15, pode-se observar que a máxima capacidade adsortiva da matriz mesoporosa ocorreu em 360 min com uma retenção de 184 mg g⁻¹ do fármaco, quando hexano foi utilizado. Para o carregamento utilizando o etanol, o tempo foi de 120 min, com uma retenção superior, sendo de 189 mg g⁻¹, conforme ilustrada na Figura 4.15. **Figura 4.15 -** Isoterma de tempo do carregamento de ibuprofeno no sólido HA1B, nos solventes hexano (a) e etanol (b) a 298K.



Vale destacar que estes ensaios foram realizados a temperatura ambiente e vedados todos os recipientes, garantindo que o solvente não evaporasse durante os experimentos devido à sua alta volatilidade.

Verifica-se que as hidroxiapatitas mesoporosas, sintetizadas utilizando caseína como direcionador apresenta boa capacidade de carregamento de fármaco e, portanto apresentam-se como matrizes promissoras na liberação controlada do fármaco.

4.2.5 Ensaio de liberação do ibuprofeno

Os testes de liberação foram realizados por um período de 120 horas. A concentração do fármaco no sobrenadante foi determinada por espectroscopia de absorção molecular na região UV-Vis, utilizando o método de adição de padrão, cuja quantidade de fármaco incorporada foi de 189 mg g⁻¹. Sendo corrigida em termos de concentração cumulativa do fármaco (C_C) no fluido de liberação simulado, conforme a Equação 4.2.

$$C_c = C_f + (5_* C_f) / 300$$
 Equação (4.2)

Na Figura 4.16 encontra-se o perfil de liberação do ibuprofeno no sólido mesoporoso em que se verificou nas 24 h iniciais um perfil de liberação mais rápido, sendo liberado cerca de 90% de ibuprofeno no fluido. A liberação torna-se mais lenta após 24 h atingindo o equilíbrio após as 38 h de liberação. O máximo de liberação foi de aproximadamente 97% após 50 h. Sugere-se que o fármaco liberado nas primeiras 24 h esteja interagindo com a superfície do material e a cinética lenta de liberação pode ser atribuída à liberação do fármaco presente no interior dos poros.

Figura 4.16 - Perfil de liberação do ibuprofeno na matriz mesoporosa HA1B a temperatura de 310 K no fluido corpóreo simulado.



Aghaei *et al,* (2014) observaram que após 24 h o ibuprofeno carregado no nanocompósito MCM/HA foi 100% liberado no SBF. Oner *et al*, (2011) verificaram que nos materiais com diâmetros de poros diferentes, a taxa de liberação foi elevada nas primeiras 15 h, o que eles destacaram como um comportamento típico de sistema de entrega de fármaco controlado por difusão. Neste estudo verificou-se que após 1 h cerca de 50% do fármaco adsorvido na hidroxiapatita porosa foi liberado no SBF. Como mencionado em um estudo realizado por Baradari *et al*, (2012), a liberação de ibuprofeno no fosfato de cálcio é composta por duas fases: uma liberação rápida de 70% nos primeiros 15 minutos, seguida por uma liberação lenta do ibuprofeno remanescente.

A cinética de liberação em sistemas mesoporosos é frequentemente descrita utilizando o modelo de Higuchi (AGHAEI *et al.,* 2014). Na Figura 4.17 observa-se o ajuste dos dados a este modelo no qual se verificou um bom ajuste com r^2 de 0,99. O valor da constante K foi de 32 %. $h^{-0.5}$.

Figura 4.17 - Modelo de Higuchi para o estudo da liberação do ibuprofeno na matriz HA1B no fluido corpóreo simulado a 310K.



Capítulo 5

Conclusões

5. Conclusões

As amostras de hidroxiapatita pura e mesoporosa foram sintetizadas a partir de duas fontes de cálcio distintas, os precursores nitrato de cálcio e cloreto de cálcio. As formas mesoporosas foram obtidas empregando caseína como direcionador de poros.

As isotermas de adsorção de N₂ demonstraram que os sólidos após a modificação com surfactante apresentaram maior área superficial, sendo de 114 m² g⁻¹ para HA1A com volume e diâmetro de poro de 0,30 cm³ g⁻¹ e 15,2 nm, já o sólido HA2A obteve uma área de 147 m² g⁻¹ com os respectivos volumes e diâmetro de poro de 0,29 cm³ g⁻¹ e 9,7 nm.

Verificou-se que após o tratamento térmico as amostras tratadas com caseína apresentaram área superficial menor e o diâmetro de poro maior, sendo de 90 m² g⁻¹ e 24,5 nm para o sistema HA1B e 86 m² g⁻¹ e 24 nm para o sólido HA2B.

A investigação da reprodutibilidade mostrou que a síntese pelo método de co-precipitação reproduziu os valores de área superficial, volume e diâmetro de poro para o sólido HA1A.

Todos os sólidos sintetizados sem e com agente direcionador formaram materiais monofásicos.

Os ensaios de carregamento indicaram que com a diminuição da polaridade do solvente ocorreu um aumento na incorporação do fármaco. A maior quantidade de ibuprofeno foi observada nas matrizes que não receberam o tratamento térmico HA1A.

Os dados das análises termogravimétricas indicaram que as amostras HA1A carregadas com ibuprofeno apresentaram maior perda de massa na segunda etapa, indicando nesta temperatura uma maior eliminação da matéria orgânica provinda da incorporação do fármaco.

Os ensaios de carregamento do fármaco mostraram uma retenção de 184 mg g⁻¹ na matriz mesoporosa utilizando hexano como solvente, em um tempo de 360 min. Para o carregamento

utilizando o etanol este tempo foi de 120 min, com uma retenção de 184 mg g^{-1} .

O ensaio da isoterma de liberação do fármaco carregado no sólido HA1B mostrou uma cinética de liberação rápida nas primeiras 24 h, seguida por uma cinética lenta, atingindo o equilíbrio depois de 38 h. O máximo de liberação foi de 97% após 50 h. O sistema se ajustou ao modelo de Higuchi, com o valor de K de 32 %.h^{-0,5}.

Capítulo 6

Referências

6. Referências bibliográficas

- ABDAL-HAY, A.; VANEGAS, P.; HAMDY, A.S.; ENGEL, F. B.; LIM, J, H. Preparation and Characterization of Vertically Arrayed Hydroxyapatite Nanoplates on Electrospun Nanofibers for Bone Tissue Engineering. *Chemical Engineering Journal*. p. 132-141, 2014.
- ABDEL-AAL, E.; EL-MIDANY, A.; EL-SHALL, H. Mechanochemicalhydrothermal preparation of nano-crystallite hydroxyapatite using statistical design. *Materials Chemistry and Physics*, v. 112, p. 202-207, 2008.
- ABIOYE, A.; OLUSEGUN.; KOLA-MUSTAPHA, A.; RUPARELIA, K. Impact of in situ granulation and temperature quenching on crystal habit and micromeritic properties of ibuprofen-cationic dextran conjugate crystanules. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 462, p. 83–102, 2014.
- ADOLFSSON, E.; NYGREN, M.; HERMANSSON, L. Decomposition Mechanisms in Aluminum Oxide-Apatite Systems. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 82, p.2909-2912, 1999.
- ARCOS, DANIEL; VALLET-REGÍ- Bioceramics for drug delivery. *Acta materialia*, p. 1359-6454. v. 61, p. 890 -911, 2013.
- AGHAEI, H.; ABBAS NOURBAKHSH, A.; KARBASI, S. ET AL. Investigation on bioactivity and cytotoxicity of mesoporous nano-composite MCM-48/hydroxyapatite for ibuprofen drug delivery. *Ceramics International*, v. 40, p. 7355–7362, 2014.
- AGHAYAN M, RODRÍGUEZ M. Influence of fuels and combustion aids on solution combustion synthesis of Bi-phasic Calcium

Phosphates (BCP). *Materials Science and Engineering: C*, v. 32, p. 2464-2468, 2012.

- AHMED, M.A.; MANSOUR, S.F.; EL-DEK, S.I.; ABD-ELWAHAB, S.M.; AHMED, M.K. Characterization and annealing performance of calcium phosphate nanoparticles synthesized by coprecipitation method. *Ceramics International*, 2014.
- AMER, W.; ABDELOUAHDI, K.; RAMANANARIVO, H. R.; ZAHOUILY,
 M.; COPPEL, A. F. Y.; VARMA, R. S.; SOLHY, A. Synthesis of mesoporous nano-hydroxyapatite using surfactant zwitterions.
 Materials Letters, v. 107, p. 189-193, 2013.
- AMINZARE, M.; ESKANDARI, A.; BAROONIAN, MH.; BERENOV, A.; HESABI, Z. R.; TAHERIUM, M.; SADRNEZHAAD, SK. Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties. *Ceramics International*, v. 39, P. 2197-2206, 2013.
- BADER, M.A. Systematic Approach to Standard Addition Methods in Instrumental Analysis. Journal Chemistry Education, p. 703, 1980.
- BARADARI, H.; DAMIA C.; DUTREIH-COLAS, M.; LABORDE,E.; VIANA, M. Calcium phosphate porous pellets as drug delivery systems: Effect of drug carrier composition on drug loading and *in vitro* release. *Journal of the European Ceramic Society.* v. 32, p. 2679–2690, 2012.
- BARRALETA, J.E.; GROVERA, L.; GAUNTA, T.; WRIGHTB, A.J.; GIBSONC, I.R. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. *Biomaterials*, v. 23, p. 3063–3072, 2002.
- BARRET, E.P.; JOYNER, L.G.; HALENDA, P.P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I.

Computations from Nitrogen Isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, v. 73, p. 373-380, 1951.

- BEST, S.M.; PORTER, A.E.; THIAN, E.S.; HUANG, J. Bioceramics: past, present and future, *Journal of the European Ceramic Society*, v. 28, p. 1319-1327, 2008.
- BAUM, C.; BAUM, D.L.; KENNEDY, M.B. Forbes Utilization of nonsteroidalantiinflammatory drugs. *Rheumatoid Arthritis*, v. 26 p. 686–692, 1985.
- BARBOSA, J. H. P. Nanocompósitos de fosfato de cálcio com óxido de titânio –Síntese e caracterizações. 2012, 71 p, Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa , 2012.
- BASTAKOTI, B.P.; Inuoe, M.; Wu, C.; Nakashima, K. A block copolymer micelle template for synthesis of hollow calcium phosphate nanospheres with excellent biocompatibility. **Inorganic Chemistry Communications,** v. 48, p. 6532– 6534, 2012.
- BETSIOU, M.; BANTSISA, G.; ZOIB, L.; SIKALIDIS, C. Adsorption and release of gemcitabine hydrochloride and oxaliplatin by hydroxyapatite. *Ceramics International*, v. 38, p. 2719– 2724, 2012.
- BOANINIA, E.; GAZZANOB, M.; BIGI, A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. Acta Biomaterials, v. 6, p. 1882–1894, 2010.
- BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: *Acta Biomaterials*, v. 8, p. 1401-1421, 2012.

- BOHNER, M. Calcium orthophosphate in medicine: *from ceramic calcium phosphate cements.* **Injury**, v. 31, p. 37-47, 2000.
- BOUTINGUIZA, M.; POU, J.; COMESAÑA, R.; LUSQUIÑOS, F.; DE CARLOS, A.; LEÓN, B. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering:* C, v. 32, p. 478-486, 2012.
- BRUNAUER, S.; DEMING, L.S.; DEMING, W.S.; TELLER, E. On a theory of the Van der Walls adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society*, v. 62, p. 1723- 1732, 1940.
- BRUNAUER, P.H.; EMMETT, E. Teller Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, p. 309–319, 1938.
- CAO, H.; ZHANG L.; ZHENG H.; WANG Z. Hydroxyapatite nanocrystals for biomedical applications. *Journal of Physics* and Chemistry Solids, p. 114-118, 2010.
- CICUÉNDEZ, M.; BARBA, I. I.; PORTOLÉS, M.T.; VALLET-REGI, M. Delivery of levofloxacin and biocompatibility of mesoporous materials. *European Journal of Farmacêutica e Biofarmacêutica*, v. 84, p. 115-124, 2013.
- COELHO, J.; MOREIRA, J. A.; ALMEIDA, A.; MONTEIRO, F. Synthesis and characterization of Hap nanorods from a cationic surfactant template method. *Journal of Bionic Engineering*, v. 21, p. 2543–2549, 2010.
- COLILLA, M.; VALLET-REGÍ, M. Ordered Mesoporous Silica Materials. *Comprehensive Biomaterials*, p. 497–514, 2011.
- CHO, J. S.; RHEE, S. Formation mechanism of nano-sized hydroxyapatite powders through spray pyrolysis of a calcium

phosphate solution containing polyethylene glycol. *Journal of the European Ceramic Society,* v. 33, p. 233-241, 2013.

- CULLITY, B.D. Elements of X-ray diffraction. Addison-Wesley Publishing Company: Massachusetts, 1956.
- DAUPHAS, S.; AMESTOY, M.; LLAMAS, G. Modification of the interactions between β-casein stabilised oil droplets with calcium addition and temperature changing. *Food hydrocolloids*, v. 22, p. 231–238, 2008.
- DONGDONG, L.; ZHU, Y.; LIANG, Z.; Alendronate hydroxyapatite functionalized mesoporous nanoparticles for drug deliver.
 Bulletin of Materials Research, v. 48, p. 2201-2204. 2013.
- DONG Z, LI Y, ZOU Q. Degradation and biocompatibility of porous nanohydroxyapatite/ polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. *Applied Surface Science*, p. 255:6087, 2009.
- DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, v. 31, p. 1465–1485, 2010.
- ELLIOTT, J.C. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Amsterdam: Elsevier, 1994.
- ELZOGHBY, A.O.; EL-FOTOH, W.S.A.; ELGINDY, N.A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 153, p. 206– 216, 2011.
- ESPANOL, M.; GINEBRA, M.P.; PEREZ, R.A.; MONTUFAR, E.B. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomaterials*, v. 5, p. 2752–2762, 2009.

- GUSTAVSSON, J.; GINEBRA, M.; ENGEL, E.; PLANELL, J.A. Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media. *Acta Biomaterialia*, v. 8, p. 386–393, 2012.
- FAHAMI A.; EBRAHIMI-KAHRIZSANGI R.; NASIRI-TABRIZI B. Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite/titanium nanocomposite. *Solid State Sciences*, v 13, p. 135–41, 2011.
- FAROOQ, A. K.; SALEEM, M.; AFZAL, A.; ALI, A.; KHAN, A. Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, v. 35, P. 245-252, 2014.
- FERNANDES, ANE JOSANA DANTAS. Fosfato de cálcio mesoporosos e como nanocompósitos com sílica: Síntese caracterização e ensaios de liberação controlada de fármaco. 2011, 198 p, Tese (Doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.
- FELSEN, T. Z.; Stankeviciute, J.C.; Yang.; Thomas C.K.; Yang, A.; Beganskiene, A. Kareiva . Calcium hydroxyapatite/whitlockite obtained from dairy products: Simple, environmentally benign and green preparation technology. *Ceramics International, In Press*, p. 2092-2096, 2014.
- FERNANDES, A. J. D.; BARBOSA, J. H. P.; SILVA, O. G.; FONSECA, M. G.; ARAKAKI, L. H. N. AND ESPÍNOLA J. G. P. Correlations between data of 29Si NMR and thermogravimetry for silica/monetite nanocomposites; *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*; v. 106, p. 463-467, 2011.
- FUJII, E.; OHKUBO, M.; TSURU, K.; HAYAKAWA, S.; OSAKA, A.; KAWABATA, K. ET AL. Property selective adsorption of proteins

and characterization of nano-crystalline hydroxyapatite with zinc. *Acta Biomaterils*, v. 2, p. 69-74, 2006.

- GOPI, D.; THAMEEM ANSARI, M.; SHINYJOY, E.; KAVITHA, L. Synthesis and spectroscopic characterization of magnetic hydroxyapatite nanocomposite using ultrasonic irradiation. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 87, p. 245– 250, 2012.
- GINEBRA, M.P. ET AL. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. Journal of Contrololled Release, p. 102-110, 2006.
- GINEBRA, M.P.; CANAL, C. MONTSERRAT ESPANOL. ET AL. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v. 64, p. 1090-1110, 2012.
- GUO, Y.; LONG, T.; W. CHEN.; NING C.; ZHU, Z. GUO, Y.
 Bactericidal property and biocompatibility of gentamicin-loaded mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres.
 Materials Science and Engineering: C, v. 33, 3583–3591, 2013.
- GUO, Y.; SHI, X.; FANG,Q.; ZHANG, J. Facile preparation of hydroxyapatite-chondroitin sulfate hybrid mesoporous microrods for controlled and sustained release of antitumor drugs. *Materials Letters*, v. 25, p. 111-115, 2014.
- HASHIMOTO, Y.; TAKI, T.; SATO, T. Sorption of dissolved lead from shooting range soils using hydroxyapatite amendments synthesized from industrial byproducts as affected by varying pH conditions. *Journal of Environmental Management*, v. 90, p. 1782–1789, 2009.
- HATTON, B.; LANDSKRON, K.; WHITNALL, W.; PEROVIC, D.; OZIN, G. Past, present, and future of periodic mesoporous

organosilicas - The PMOs**. Applied Surface Science**, v. 38, p. 305-312, 2005.

- HEIMANN R. B. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductivebioceramic coatings. *Surface and Coatings Technology*, v. 233, p. 27–38, 2013.
- HOLZAPFEL, B.M.; REICHERT, R. C.; SCHANTZ, J.T.; GBURECK.; RACKWITZ, L.; HUTMACHER, D.W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 65, p. 581-603, 2013.
- HONDA, M.; KAWANOBE, Y.; ISHII, K.; KONISHI, T.; MIZUMOTO, M.;
 KANZAWA, N.; MATSUMOTO, M.; AIZAWA, M. In vitro and in vivo antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route.
 Materials Science and Engineering: C, v. 33, p. 5008-5018, 2013.
- HOLLAND, B.; CORREDIG, M.; ALEXANDER, M. Gelation of casein micelles in β-casein reduced milk prepared using membrane filtration. *Food Research International*, v. 44, p. 667–671, 2011.
- HORNE, D. S. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and surfaces physicochemical and engineering aspects*. v. 213, p. 255– 263, 2003.
- HUANG. L. CHARLOTTE.; WEI LI LEE. JOACHIM S.C. LOO . Drugeluting scaffolds for bone and cartilage regeneration. *Drug Discovery Today*, v. 19, p. 714–724, 2014.
- IBRAHIM, A.; WEI, W.; ZHANG, D.; WANG, H.; LI, J. Conversion of waste eggshells to mesoporous hydroxyapatite nanoparticles

with high surface area. *Materials Letters,* v. 110, p. 195-197, 2013.

- IVANOVA, E. P.; BAZAKA, K. Crawford Natural polymer biomaterials: advanced applications. New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare, p. 32–70, 2014.
- KAYGILI, O.; KESER, S.; ORAINYC, R.H.A.; ATES, T.; YAKUPHANOGLU, F. In vitro characterization of polyvinyl alcohol assisted hydroxyapatite derived by sol-gel method, *Materials Science and Engineering: C*, v. 35, p. 239–244, 2014.
- KESSLER, A.; MENÉNDEZ-AGUIRRE, O.; HINRICHS, J.; STUBENRAUCH, C.; WEISS, J. Properties of an as-casein-rich casein fraction: Influence of dialysis on surface properties, miscibility, and micelle formation. *Physical Chemistry*, p. 3153–3160, 2011.
- KESSLER, A.; MENÉNDEZ-AGUIRRE, O.; HINRICHS, J.; ET AL. as-Casein—PE6400 mixtures: Surface properties, miscibility and self-assembly. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* v. 118, p. 49–56, 2014.
- KIM, J. M. ET AL. A avaliação Osteogenic de cálcio andaime de fosfato com poli-carregado droga (ácido láctico-co-glicólico) microesferas em cães beagle. *Silk Biomaterials for Tissue Enggineering and Regenerative Medicine*, v. 9, p.175-183, 2012.
- KLEINER, L. W.; WRIGHT, J. C.; WANG, Y. Evolution of implantable and insertable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release.* v. 181, p.1-10, 2014.
- KURCZEWSKA, J.; LEWANDOWSKI, D.; OLEJNIK, A.; SCHROEDER, G.; NOWAK, I. Double barrier as an effective method for
slower delivery rate of ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 472, p. 248-250, 2014.

- KHALFAOUI, M.; KNANI, S.; HACHICHA, M.A. New theoretical expressions for the five adsorption type isotherms classified by BET based on statistical physics treatment. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 263, p. 350-356, 2003.
- LALA, S.; SATPATI, B.; KAR, T.; PRADHAN, S.K. Structural and microstructural characterizations of nanocrystalline hydroxyapatite synthesized by mechanical alloying. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, p. 2891–2898, 2013.
- LEGEROS, R.Z. **Properties of osteoconductive biomaterials:** calcium phosphates Clin. Orthop. Relat, p. 81-98, 2002.
- Li, B.; Liao, XL.; Zheng, L.; Zhu, XD.; Wang, Z.; Fan, HS. ET AL. Effect of nanostructure osteoinductive ceramic porous biphasic calcium phosphate. *Acta Biomaterials*, v. 8, p. 3794-3804, 2012.
- LI, C.; ZHAO, L.; HAN, J.; WANG, R.; XIONG, C.; XIE X. Synthesis of citrate-stabilized hydrocolloids of hydroxyapatite through a novel two-stage method: A possible aggregates breaking mechanism of colloid formation. Journal of Colloid and Interface Science, v. 360, p. 341-349, 2011.
- LIN, K.; LIU X.; CHANG J.; ZHU Y. Facile synthesis of hydroxyapatite nanoparticles, nanowires and hollow nano-structured microspheres using similar structured hard-precursors. *Nanoscale*, p. 3052–3055, 2011.
- LIN-VIEN, DAIMAY. ET AL. *The handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules*. Academic Press. San Diego. 1991

- LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 15, p. 73–83, 2010.
- LIU. ET. AL. Preparation of enlarged pore mesoporous hydroxyapatite via method of solubilizing auxiliary model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, V. 441, p. 737-743, 2014.
- LIU, Y.; LI, Y.; YU, X. Drug delivery property, bactericidal property and cytocompatibility of magnetic mesoporous bioactive glass. *Materials Science and Engineering: C*, v. 41, p. 196-205, 2014.
- MAHABOLE, M.; AIYER, R.; RAMAKRISHNA, C.; SREEDHAR, B.; KHAIRNAR. SYNTHESIS, R. Characterization and gas sensing property of hydroxyapatite ceramic. *Materials Science of Polymers of Engineers*, v. 28, p. 535–545, 2005.
- MANZANO, MIGUEL.; VALLET-REGÍ, MARIA. Revisiting bioceramics: Bone regenerative and local drug delivery systems. *Progress in Solid State Chemistry*, v. 40, p. 17e30, 2012.
- MAVROPOULUS.; A.M. ET AL. Studies on the Mechanisms of Lead Immobilization by Hydroxyapatite. *Environmental Science and Technology*, v.36, p. 1630-1635, 2002.
- MEHRALIA, M. ET AL. Facile synthesis of calcium silicate hydrate using sodium dodecyl sulfate as a surfactant assisted by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 21, p. 735–742, 2014.
- MELÉNDEZ-ORTIZ, H.I.; MERCADO, Y.A. P.; GARCÍA-CERDA, L.A.; MERCADO-SILVA, J.A.; CASTRUITA, G. Influence of the reaction conditions on the thermal stability of mesoporous

MCM-48 silica obtained at room temperature. *Ceramics International,* v. 40, p. 4155–4161, 2014.

- MECCUSKER, L. B.; LIEBAU, F.; ENGELHARDT, G. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts. *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, p. 381-394, 2001.
- MEHDI MEHRALIA.; ET AL. Facile synthesis of calcium silicate hydrate using sodium dodecyl sulfate as a surfactant assisted by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 21, p. 735–742, 2014.
- MOUTHUY, P.A.; CROSSLEY, A.; YE, H. Fabrication of calcium phosphate fibres through electrospinning and sintering of hydroxyapatite nanoparticles, *Materials Letters*, v. 106, p. 145–150, 2013.
- MIZUSHIMA, Y.; IKOMA, T.; TANAKA, J.; HOSHI, K.; ISHIHARA, T.; OGAWA, Y.; UENO, A. Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for lipophilic drugs. *Journal of Controlled Release*, v. 10, p. 260-265, 2006.
- NASIRI-TABRIZI B.; HONARMANDI P.; EBRAHIMI-KAHRIZSANGI R. Synthesis of nanosize single-crystal hydroxyapatite via mechanochemical method. *Materials Letters*, 63:543–6, 2009.
- ONER, MUALLA.; YETIZ, E.; AY, E.; UYSAL, U. Ibuprofen release from porous hydroxyapatite tablets. *Ceramics International*, v. 37, p. 2117–2125, 2011.
- PRAMANIK, N.; IMAE, T. Fabrication and Characterization of Dendrimer-functionalized mesoporous hydroxyapatite. *Langmuir*, v. 28, p 14.018-14.027, 2012.

- POH, C.K.; NG, S.; LIM, T.Y.; TAN, H.C.; LOO, J.; WANG, W. In vitro characterizations of mesoporous hydroxyapatite as a controlled release delivery device for VEGF in orthopedic applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. A, 100, p. 3143–3150, 2012.
- PORTNAYA, I.; KHALFIN, R.; KESSELMAN, E.; RAMON, O.; COGAN, U.; DANINO, D. Mixed micellization between natural and synthetic block copolymers: β-casein and Lutrol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 84, p. 127-134, 2011.
- POST, A.; EBERT, M.; HINRICHS J. β-Casein as a bioactive precursor – ocessing for purification, *Food Hydrocolloids*, v. 64, p. 84–88, 2009.
- PADMANABHAN, S.K.; BALAKRISHNAN, A.; CHU, M.-C.; LEE, Y.J.; KIM, T.N.; CHO, S.-J. Sol-gel synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods. *Particuology*, v. 7, p. 466–470, 2009.
- ROCHELLE. L.S.C.; MELLEMA, Physical-chemical, M. Comparison of cow's milk proteins versus soy proteins in their calciumbinding capacities. *Colloids and Surfaces*, v. 366, p. 110– 112, 2010.
- ROSEN, MJ.; KUNJAPPU, JT. **Surfactants and interfacial phenomena**. John Wiley & Sons, Inc, 2012.
- SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M.; KHOSHDARGI, E. D.; AHMAD, J. Khoshdargi Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterials*, v. 9, p. 7591-7621, 2013.
- SAMAVEDIA, S.; WHITTINGTONA, A. R.; GOLDSTEINA, A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of

properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterials*, v. 9, p. 8037–8045, 2013.

- SANGEETHA, J.; JOHN PHILIP. The interaction, stability and response to an external stimulus of iron oxide nanoparticle-casein nanocomplexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 406, p. 52–60, 2012.
- SEMO, E.; Kesselman, E.; Danino, D.; Livney, Y.D. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals, Food Hydrocoll, v. 21, p. 936–942, 2007.
- SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS, SDBS. Disponível em:http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi. Arquivo capturado em 10 de junho de 2014.
- SHAPIRA, A.; ASSARAF, Y.G.; LIVNEY, Y.D. Beta-casein nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic drugs. *Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine.* v. 6, p. 119–126, 2010.
- SILVA O. G. Síntese e caracterização de híbridos inorgânicoorgânico formados a partir de reações de silanização da hidroxiapatita e monetita. 2006, 98 p, Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.
- SILVA O. G. Hidroxiapatita mesoporosa pura e modificada organicamente com grupos nitrogenados – síntese, caracterização e uso como carregadora de fármacos. 2010, 158 p, Tese (doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.
- SOEJIMA, T.; OSHIRO, S.; NAKATSUJI, Y.; ITO, S. Dense aqueous colloidal gold nanoparticles prepared from highly concentrated

precursor solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 362, p. 325–329, 2011.

- SHEN, Z.; YU, T.; YE, J. Microstructure and properties of alendronateloaded calcium phosphate cement. *Materials Science and Engineering: C*, v. 42, p. 303-311, 2014.
- SLOSARCZYK, A.; SZYMURA-OLEKSIAK, J.; MYCEK, B. The kinetics of release from implants loaded drug pentoxifylline hydroxyapatite. *Biomaterials*, v. 21, p 1215-1221, 2000.
- SESHIMA, H.; YOSHINARI, M.; TAKEMOTO, S.; HATTORI, M.; KAWADA, E.; INOUE, T.; ODA, Y. Control the release of bisphosphonate with hydroxyapatite granules. *Journalof the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* v. 78, p. 215-221, 2006.
- SZYK-WARSZYNSKAA, L.; GERGELYB, C.; JAREKA, E.; CUISINIERC, F.; SOCHAA, R.P.; WARSZYNSKIA, P. Calcium uptake by casein embedded in polyelectrolyte multilayer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineerring Aspects*, v. 10, p. 118 – 126, 2009.
- SKOOG, D.A., WEST, D.M.; HOLLER, F. J. *Fundamentals of Analytical Chemistry.* 7 ed. New York: Saunders, 1996.
- SUN, Q.; LOU, J.; KANG, F. Facile preparation of hydroxyapatite nanotubes assisted by needle-like calcium carbonate. *Powder Technology*, v. 261, p. 49-54, 2014.
 - TIAN, T.; JIANG, D.; ZHANG, J.; LIN, Q. Synthesis of Si-substituted hydroxyapatite by a wet mechanochemical method. *Materials Science and Engineering: C*, v. 28, p 57-63, 2008.

VALLET-REGÍ, M.; COLILLA, M. Ordered Mesoporous Silica Materials. **Comprehensive Biomaterials,** p. 497–514, 2011.

- VALLET-REGÍ, M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Renduns Chimie*. v. 13, p. 174–185, 2010.
- VALLET-REGI M. Ceramics for medical applications. *Journal of Saudi Chemistry Society.* p. 97–108, 2001.
- VALLET-REGI, M.; MILA, A. A new property of MCM-41: drug delivery system. *Chemistry Materials*. v. 13, p. 308-311, 2001.
- VERMA, G.; BARICK, K.C.; MANOJ, N.; SAHU, A.K.; P.A. Hassan. Rodlike micelle templated synthesis of porous hydroxyapatite. *Ceramics International*, v. 39, p. 8995–9002. 2013.
- VERRON, E.; KHAIROUN, I.; GUICHEUX, J. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. *Drug Discovery Today*, v. 15, p. 547-552, 2010.
- VILCHIS-GRANADOS, J.; GRANADOS-CORREA, F.; BARRERA-DÍAZ, C.E. Surface fractal dimensions and textural properties of mesoporous alkaline-earth hydroxyapatites. *Applied Surface Science*, v. 279, p. 97–102, 2013.
- WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, v. 30, p. 5897-5909, 2009.
- WANG, Y.; CHEN, T.; WEI, Y.; CHU, L.; GUO, Y. Hollow carbonated hydroxyapatite microspheres with mesoporous structure: Hydrothermal fabrication and drug delivery property, *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, p. 3166–3172, 2013.
- WU, C.; CHANG, J. Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. *Interface Focus*, v. 2, p. 292–306, 2012.

- YANG, P.; QUAN, Z.; LI, C.; KANG, X.; J. Lin Bioactive, and mesoporous luminescent europium-doped hydroxyapatite as a carrier of drug. **Biomaterials**, v. 29, p. 4341-4347, 2008.
- YANG, C.; GUO, W.; CUI, L.; XIANG, D.; CAI, K. pH-responsive controlled-release system based on mesoporous bioglass materials capped with mineralized hydroxyapatite. *Materials Science nd Engineering: C*, v. 36, p. 237-243, 2014.
- YE, X.; CAI, S.; XU, G.; DOU, Y.; HU, H. Preparation and in vitro evaluation of mesoporous hydroxyapatite coated β-TCP porous scaffolds. *Materials Science and Engineering*: C, v. 3, p. 5001-5007, 2013.
- YOU, J.; CHIE, K.; FANG, K. Adsorption and Desorption of Bioactive Proteins on Hydroxyapatite for Protein Delivery Systems. *Journal of Drug Delivery*, p. 89-94, 2012.
- ZHANG, C.; C. LI.; HUANG, S.; HOU, Z.; CHENG, Z.; YANG, P. ET AL. Self-activated luminescent and mesoporous strontium hydroxyapatite nanorods for drug delivery. *Biomaterials*, 31, p. 3374–3383, 2010.
- ZHANG, J.; FUJIWARA, M.; XU, Q.; ZHU, Y.; IWASA, M.; JIANG, D. Synthesis of mesoporous calcium phosphate using hybrid templates. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 11, p. 411–41, 2008.
- ZHAO, H.; He, W.; Wang, Y.; Yue, Y.; Gao, X. Biomineralizing synthesis of mesoporous hydroxyapatite-calcium pyrophosphate polycrystal using ovalbumin as biosurfactant. *Materials Chemistry and Physics*, v. 111, p. 265-270, 2008.

- ZHAO, J.; CHEN, J.; WANG, X.; HAN,Z. Rietveld refinement of hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by solution combustion method. *Ceramics International.* v. 40, p. 3379-3388, 2014.
- ZHANG, J.; LIU, G.; WU, Q.; ZUO, J. Novel Mesoporous Hydroxyapatite/Chitosan Composite for Bone Repair. Journal of Bionic Engineering, v. 9, p. 243-251, 2012.
- ZHENG, J.; LI, Y.; SHI, Y.F.; ZHANG, L.M.; ZHOU, Z.R. Microtribological behaviour of human tooth enamel and artificial hydroxyapatite. *Tribology International*, v. 63, p. 177-185, 2013.
- ZENG, F. ET AL. Preparation ofenlargedporemesoporous hydroxyapatite via method of solubilizing gauxiliary model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*, v. 441, p. 737–743, 2014.
- ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, p. 2769–2781, 2011.
- ZHU, M.; ZHANG, J.; TAO, C.; HE, X.; ZHU, Y. Design of mesoporous bioactive glass/hydroxyapatite composites for controllable codelivery of chemotherapeutic drugs and proteins, *Materials Letters*, v. 115, p. 194–197, 2014.