

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS**

JÚNIO AUGUSTO RODRIGUES PASQUAL

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EM CIMENTO DE FOSFATO
TRÍCÁLCICO POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA**

Porto Alegre

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
JÚNIO AUGUSTO RODRIGUES PASQUAL**

**ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EM CIMENTO DE FOSFATO
TRÍCALCICO POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGE3M da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de Concentração: Ciências dos Materiais.

Orientadora: Prof. Dra. Vânia Caldas de Sousa

Co-Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos

Porto Alegre

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Reitor: Rui Vicente Oppermann

Vice-Reitora: Jane Fraga Tutikian

ESCOLA DE ENGENHARIA

Diretor: Luiz Carlos Pinto da Silva Filho

Vice-Diretora: Carla Schwengber ten Caten

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Coordenador: Carlos Pérez Bergmann

*Todo o esforço despendido nesse trabalho eu dedico à minha família.
Sou quem sou e vou aonde vou porque os tenho comigo me apoiando, cada um do seu modo
mesmo nas distâncias.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, pelo apoio incondicional. São a inspiração que completa minha vida.

À Profa. Vânia, por me aceitar em seu grupo de pesquisa mesmo com meu pouco conhecimento da área, dando a oportunidade da verdadeira vivência em um laboratório e seus desafios. Com certeza, me sinto mais pertencente ao ambiente de pesquisa agora.

Ao Prof. Luis Alberto, pela co-orientação durante os trabalhos, proporcionando um grande aprendizado científico e profissional.

Ao Jose Jurado, que me iniciou nos estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica, sempre incentivando e com paciência para as minhas dificuldades de aprendizado.

Ao Júlio Colpo, por confiar a mim a continuação de seus trabalhos e pela ajuda durante os experimentos.

Aos colegas do LABIOMAT E LACAV, por me proporcionarem um crescimento de uma magnitude inimaginável. Meu desenvolvimento como pesquisador teve a contribuição de cada um com quem tive contato, desde os IC's até os professores que conheci.

Aos alunos de IC's Breno Lobo e Lucas Freisleben, pela grande ajuda durante os experimentos.

Ao CNPQ, pelo custeio da bolsa.

Ao LACER, em especial à Márcia, pelas análises de DRX com uma rapidez fora do comum.

Ao LACOR, pela disponibilidade de espaço e equipamento para realização das medições de UV-Vis.

À Metrohm do Brasil, em especial, ao André, Jonas e Paula, pela paciência para sanar minhas dúvidas, desde as mais simples até as mais complexas.

Aos amigos de Minas Gerais em PoA; Rakely, Tássylla, Elizane e Nathália, por me receberem no começo da jornada fazendo a distância de casa menos difícil de suportar.

À Ingridy, que esteve comigo em todos os momentos fisicamente ou á distância, me confortando e dando forças pra caminhada.

As pessoas importantes que conheci no RS, em especial ao pessoal da Rua Euclides da Cunha; Amália, Oscar, Dona Duda e Sr. Renato.

À Profa. Aline Rigon Zimmer da Faculdade de Farmácia de UFRGS, e ao Javier Aragón pela ajuda durante as discussões.

À minha família. Só me senti pronto pra encarar esse desafio porque soube que vocês estavam comigo.

EPÍGRAFE

“O voo até a Lua não é tão longe. As distâncias maiores que devemos percorrer estão dentro de nós mesmos.”

Charles de Gaulle

RESUMO

Os desenvolvimentos tecnológicos nas diversas áreas da saúde buscam mais opções para manutenção da qualidade de vida da população, atentando para a eliminação dos fatores que levam à redução na expectativa de vida. Na área de biomateriais e liberação de fármacos são de grande importância os estudos dos mecanismos que controlam a interação do fármaco incorporado em matriz de biomaterial, além da identificação dos fenômenos decorrentes do seu processo de liberação do medicamento. Dentre as técnicas comumente utilizadas para identificação das quantidades de fármacos liberados em solução estão as técnicas de Espectroscopia de Absorbância no Ultravioleta Visível, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ensaio de Imunofluorescência por Polarização. Essas técnicas possibilitam determinação da quantidade de medicamento liberado em solução com o passar do tempo, porém necessitam de preparações diferentes de amostras e não possibilitam medições de concentração durante o teste de liberação. O trabalho em questão apresenta a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) como uma técnica promissora e original na determinação da quantidade de fármaco liberado em meio aquoso. A técnica relaciona a variação da concentração em solução devido ao processo de liberação controlada, com a resistência elétrica da solução que recebeu esse fármaco. Realizando várias medições com variações de parâmetros ligados à medição e a interação entre fármaco, solução e cimento de fosfato de cálcio, estabeleceu-se a padronização do experimento juntamente com a verificação da influência de cada variável escolhida no processo de liberação. Depois de obter essa padronização, foi verificada a relação de alta sensibilidade entre resistência à polarização (R_p) que variou em 632,59 % devido ao gradiente de concentração do fármaco em solução durante teste de liberação. O perfil de liberação em matriz de cimento de fosfato de cálcio para os fármacos, em função do tempo obtido por EIS, foi semelhante ao obtido por UV-Vis após aplicar um fator de correção de 12 para cloridrato de lidocaína e de 70 para sulfato de gentamicina, juntamente com a consideração de um comportamento cumulativo.

Palavras-chave: Espectroscopia de impedância eletroquímica, liberação de fármacos, padronização de método.

ABSTRACT

The technological developments on the health areas have looking for more options to maintenance of the population quality of life, always with open eyes facing to the factors eliminating which led to a reduction of life expectancy. On the biomaterials area and drug release are of great importance the studies of the mechanisms that control the interaction between the incorporated drug and the biomaterial matrix, in addition to the identification of the phenomena arising from the delivery process of this drug. Among the techniques commonly used to identify the drug delivery quantity are the Ultraviolet–visible spectroscopy, High-performance liquid chromatography and Fluorescence polarization immunoassay techniques. These techniques are consolidated in determining the release profile of a drug in solution over time, but require different aliquots preparation and do not allow concentration measurements during the release test. The work presents the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) as a promising and original technique in determining the amount of drug released in an aqueous medium. The technique relates variation of the concentration in a solution due to the controlled release process with the electrical resistance of the solution that received this drug. Performing several measurements with variation of parameters linked to the measurement and the interaction between drugs, solution and calcium phosphate cement, it was established the standardization of the experiment together with the verification of the influence of each variable chosen in the release process. After obtaining this standardization, it was verified the high sensitivity relation between the polarization resistance (R_p) that varied in 632,59% due to the concentration gradient of this drug in solution during the controlled release test, which becomes important information in the determination of the drug concentration in solution by EIS. The drug release profile for a calcium phosphate cement matrix as a function of time obtained by EIS was similar to the profile obtained by UV-Vis measurement after applying a correction factor of 12 to the lidocaine chloridrate and 70 to the gentamicin sulphate and with a cumulative behavior.

Keywords: Electrochemical impedance spectroscopy, drug delivery, method standardization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aplicações médicas comuns e tipos polímeros usados em medicina. Adaptado de REFOJO, 1996 ⁴² .	8
Figura 2 - Comparação da espessura da camada de reação do implante bioativos de tecido fibroso de biocerâmicas inativas em ossos. Adaptado de HENCH, 1991 ⁴⁵ .	10
Figura 3 – Variação da solubilidade em água de vários fosfatos de cálcio obtidos por ácido fosfórico neutralizado em relação à relação cálcio e fósforo (Ca/P). Adaptado de LEÓN, 2009 ⁵⁵ .	15
Figura 4 - Influência do tamanho de partícula e a razão L/P na porosidade intrínseca do CFC. Fonte: VÁSQUEZ, 2016 ⁸ .	19
Figura 5 - Características dos cimentos apatíticos. Adaptado de VÁSQUEZ, 2016 ⁸ .	20
Figura 6 - Rotas de administração de medicamentos. Adaptado de TIBBITT et. al. 2016 ⁶⁶ .	21
Figura 7 - Três regiões de uma curva típica de cinética de liberação de fármacos. Adaptado de PARENT, 2017 ⁴⁶ .	25
Figura 8 - Fórmula estrutural do sulfato de gentamicina.	27
Figura 9 - Fórmula estrutural do cloridrato de lidocaína.	29
Figura 10 - Definição de resistência Ôhmica. Adaptado de SANTOS, 2007. ¹⁰⁸ .	34
Figura 11 - Modelo de Helmholtz (a) para um eletrodo de superfície plana e (b) a variação da concentração na interface. Adaptado de BRETT, 1993 ¹¹² .	37
Figura 12 - Modelo de Gouy-Chapman. Adaptado de BRETT, 1993 e TICIANELLI 2005 ^{111,112} .	38
Figura 13 – Proposta de Stern. Adaptado de TICIANELLI, 2005 ¹¹¹ .	39
Figura 14 - Sinal típico de perturbação para voltametria cíclica – um formato de onda potencial triangular com potenciais de comutação de 0,8 até -0,2V versus eletrodo de calomelano saturado (SCE). Adaptado de KISSINGER, 1993 ¹⁰⁹ .	41
Figura 15 - Desenho do estudo de liberação de fármacos em matriz de CFC.	43
Figura 16 - Nomenclatura das amostras estudadas.	45
Figura 17 - Célula eletroquímica para liberação de fármacos <i>in situ</i> continuamente.	47
Figura 18 – Difractogramas de pós de cimento da fase α -TCP.	55
Figura 19 - Distribuição granulométrica do cimento α -TCP após moagem manual e peneiramento em peneira malha ABNT 325#.	57
Figura 20 - Valores de P, PA, AbL e DA para as amostras CFC-C Pré, CFC-G Pré e CFC-L Pré.	58
Figura 21 - Resultados ensaio de resistência mecânica à compressão.	61
Figura 22 – Imagens obtidas por MEV das amostras de (a) CFC-B Pré, (b) CFC-B Pós, (c) CFC-G Pré e (d) CFC-G Pós, (e) CFC-L Pré e (f) CFC-L Pós.	63
Figura 23 - Voltamograma de PBS com 30 ciclos de medições.	64
Figura 24 - Diagrama de Nyquist com variação de amplitude para solução tampão.	66

Figura 25 - Diagramas de Nyquist para variações de BIAS para medições de impedância em solução tampão de (a) -2 V até -2 V e (b) ampliação dos resultados em altas frequências.....	67
Figura 26 - Medições de impedância em PBS realizadas com e sem N^2 utilizando Bias de 1,11 V, amplitude de 20 mV e frequência de 10^{-1} a 10^5 Hz.....	68
Figura 27 - Medições de impedância solução tampão realizadas com e sem AM. * Bias de 1,11 V, amplitude de 20 mV e frequência de 10^{-1} a 10^5 Hz.	70
Figura 28 - Diagrama de Bode para PBS com e sem AM.	70
Figura 29 - Medições de impedância de CFC-C realizadas (a) sem AM e (b) com AM. * Bias de 1,11 V, amplitude de 20 mV e frequência de 10^{-1} a 10^5 Hz.	71
Figura 30 - Diagrama de Nyquist para medições de impedância de PBS e PBS com CFC-C realizadas com AM. * Bias de 1,11 V, amplitude de 20 mV e frequência de 10^{-1} a 10^5 Hz.....	73
Figura 31 - Diagrama frequência versus impedância para PBS, CFC-C com AM e CFC-C sem AM...	74
Figura 32 - Perfis de liberação de fármacos para as amostras (a) CFC-G e (b) CFC-L.	75
Figura 33 - Diagrama (a) de Nyquist e (b) de Bode para medições de impedância CFC-C, CFC-G e CFC-L realizadas com AM para médias de 8 horas.	77
Figura 34 - Espectro característico para o sistema estudado juntamente com os semicírculos que dão origem a esse espectro.	79
Figura 35 - Circuito equivalente para medições de liberação de fármaco em PBS.	80
Figura 36 - Esquema de fenômenos durante medição de EIS para amostra CFC-L.....	82
Figura 37 – Capacitância (a) Q_{CT} , (b) Q_{Dif} e (c) Q_P em função do tempo para as amostras PBS, CFC-C, CFC-G e CFC-L.....	83
Figura 38 – Efeito do tempo sobre a resistência elétrica em (a) R_{CT} , (b) R_{Dif} e (c) R_P para as amostras PBS, CFC-C, CFC-G e CFC-L.	84
Figura 39 - Perfil de liberação de fármacos por EIS para as amostras CFC-G e CFC-L.	86
Figura 40 - Perfis de liberação obtidos por (a) e (c) UV-Vis e (b) e (d) EIS.....	87
Figura 41 - Resistência para medições em corrente contínua e corrente alternada para (a) CFC-C, (b) CFC-G e (c) CFC-L.....	89

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Implantes de materiais classificados com base no tipo de material utilizado e na resposta biológica que eles provocam quando implantados. Adaptado de SAINI, 2015 ³⁹.....</i>	11
<i>Tabela 2 - Ortofosfatos de cálcio existentes e suas propriedades. Adaptado de DOROZHKIN, 2017; LEÓN, 2009 e VÁSQUEZ, 2016 ^{8,50,55}.....</i>	15
<i>Tabela 3 - Solução tampão fosfato pH 7,4¹¹⁷.....</i>	45
<i>Tabela 4 - Parâmetros variados durante a calibração do método.....</i>	48
<i>Tabela 5 - Distribuição de tamanho de partículas do pó de cimento da fase α-TCP.....</i>	57
<i>Tabela 6 – Análise dos resultados de Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente e Absorção de líquido para os três tipos de amostras estudadas.....</i>	59
<i>Tabela 7 - Equações e R^2 obtidas das curvas de calibração por UV-Vis para CFC-G e CFC-L.....</i>	75
<i>Tabela 8 – Percentual de variação dos valores de impedância para CFC-G e CFC-L em comparação com CFC-C.....</i>	77
<i>Tabela 9 - Médias dos valores de X^2 para as amostras CFC-C, CFC-G e CFC-L.....</i>	81
<i>Tabela 10 - Variação dos valores de R_{Dif} e R_P devido à presença de SG e CL em comparação com a amostra CFC-C.....</i>	84
<i>Tabela 11 - Equações e R^2 obtidos das curvas de calibração por EIS para CFC-G e CFC-L.....</i>	85

LISTA DE ABREVIATÖES

- α -TCP - Fase alfa do fosfato tricálcico;
 β -TCP - Fase beta do fosfato tricálcico;
AbL – Absorção de líquido
AL – Anestésico local;
AM – Agitação magnética;
CaP's – Fosfatos de cálcio;
CC – Curva de calibração
CDHA - Hidroxiapatita deficiente em cálcio;
CFC - Cimento de fosfato de cálcio;
CL – Cloridrato de lidocaína;
CT – Transferência de carga;
DA - Densidade aparente;
DCPD - Fosfato de dicálcico dihidratado;
DL – Dupla camada elétrica;
DR – Densidade real;
DRX - Difração de raios X;
EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica;
GDL – Granulometria por difração a laser;
HAp - Hidroxiapatita;
ICDD - International Center for Diffraction Data;
IHP - Plano interno de Helmholtz;
MA – Método de Arquimedes;
MEV - Microscopia eletrônica de varredura;
MS - Massa seca;
OHP - Plano externo de Helmholtz;
P – Porosidade total;
PA - Porosidade aparente;
PBS - Phosphate buffered solution (solução tampão fosfato salino);

Pi – Peso imerso;

ρ_l – Densidade do meio líquido;

Ps – Peso seco;

Pt – Porosidade total

Pu – Peso úmido;

RMC – Resistência mecânica à compressão axial;

SG – Sulfato de gentamicina;

SEG - Sistema eletroquímico global

SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária;

TCP - Fosfato tricálcico;

UV - Ultravioleta;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Geral.....	3
2.2 Específico.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Biomateriais.....	4
3.1.1 Biocompatibilidade e Biofuncionalidade	5
3.2 Classificação dos Biomateriais	6
3.2.1 Classificação Quanto à Origem	6
3.2.2 Classificação Quanto à Reação Biológica	9
3.2.3 Classificação Quanto às Características Físicas	11
3.2.4 Classificação Quanto à Propriedade Biológica.....	11
3.3 Biocerâmicos	12
3.3.1 Fosfato de Cálcio.....	13
3.4 Cimento de Fosfato de Cálcio	18
3.4.1 Cimentos Apatíticos.....	20
3.4.2 Cimentos de α -Fosfato Tricálcico	20
3.5 Cimentos de Fosfato de Cálcio como Sistema de Liberação de Fármacos	21
3.5.1 Porosidade	22
3.5.2 Cinética de Liberação.....	23
3.6 Fármacos	25
3.6.1 Sulfato de Gentamicina	26
3.6.2 Cloridrato de Lidocaína.....	28
3.8 Métodos de Medições de Liberação de Fármaco.....	30
3.8.1 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível (UV-Vis)	30
3.8.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	32

3.8.3 Ensaio de Imunofluorescência por Polarização (FPIA)	33
3.9 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)	33
3.9.1 EIS para Liberação de Fármacos em Matriz de CFC	35
3.9.2 Dupla Camada Elétrica.....	36
3.9.3 Resistência à Polarização	40
3.11 Voltametria Cíclica.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Preparação das Amostras	44
4.2 Preparação da Solução Tampão Fosfato	45
4.3 Liberação de Fármacos	46
4.4 Célula Eletroquímica	47
4.5 Caracterizações do Pó de CFC e dos Corpos de Prova com e sem Fármacos	48
4.5.1 Difração de Raios X (DRX).....	48
4.5.2 Granulometria por Difração a Laser	48
4.5.3 Método de Arquimedes	49
4.5.4 Resistência Mecânica à Compressão Axial.....	50
4.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	51
4.6 Análise da Liberação de Fármacos durante Teste <i>in Vitro</i>	51
4.6.1 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível.....	52
4.6.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1 Caracterizações do α -TCP	55
5.1.1 Influência dos Fármacos e do Teste de Liberação na Formação das Fases no Cimento	55
5.1.2 Tamanho Médio e Distribuição Granulométrica das Partículas	56

5.1.3 Densidade Aparente, Porosidade Total, Porosidade Aparente e Absorção do Líquido.....	58
5.1.4 Efeito da Presença de Fármacos sobre a Resistência à Compressão Axial	60
5.1.5 Influência dos Fármacos sobre a Microestrutura do α -TCP	62
5.2 Seleção do BIAS por Voltametria Cíclica em PBS	64
5.3 Padronização do Teste de Liberação de Fármacos por EIS	65
5.3.1 Influência da Variação de Amplitude (potencial AC) sobre a Liberação de Fármacos	65
5.3.2 Variação de BIAS	66
5.3.3 Influência da Injeção de Nitrogênio sobre os EIS	68
5.3.4 Análise da Agitação Magnética (AM).....	69
5.3.5 Medições de PBS <i>versus</i> Medições de CFC-C Imerso em PBS	72
5.4 Liberação de Fármacos.....	74
5.4.1 Perfil de Liberação <i>in Vitro</i> por UV-Vis	74
5.4.2 Liberação <i>In situ</i> Continuadamente por EIS	76
5.4.3 Liberação <i>In situ</i> Continuadamente em Potencial de Corrente Contínua	88
6. CONCLUSÕES.....	90
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
8. REFERÊNCIAS.....	93

1. INTRODUÇÃO

Os estudos voltados para o desenvolvimento tecnológico na área da saúde têm possibilitado avanços que resultam em ferramentas importantes, aumentando o leque de intervenções médicas e culminando no prolongamento da expectativa de vida da população ano após ano ¹. O uso de materiais como substitutos temporários ou definitivos de partes do corpo humano é uma ferramenta importante, que proporciona um método interessante de melhoria da qualidade de vida da população ².

Um tipo de biomaterial cerâmico bastante utilizado é o cimento de fosfato de cálcio (CFC). Os estudos desse material, com o passar dos anos e os avanços nas pesquisas, culminaram em vários sistemas CFC, dentre eles o sistema de cimento de α -fosfato tricálcico (sigla em inglês α -TCP), muito importante por formar hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) durante reação de pega ³⁻⁵. Sua utilização como biomaterial iniciou-se nos anos 90 ^{2,3}.

Este cimento possui cálcio e fósforo em proporção próxima aquela encontrada no sistema ósseo humano ($Ca/P = 1,67$), o que possibilita uma maior biocompatibilidade, ou seja, esses materiais e seus produtos são toleráveis pelo tecido envoltório e não causam disfunções no organismo ⁶⁻⁸. Essa propriedade do α -TCP o torna um material interessante na utilização como veículo, transportando cargas de fármacos, assim como já é largamente aplicado com biopolímeros ⁹⁻¹². Dentre os vários fármacos utilizados em pesquisas objetivando o controle do processo de liberação, estão o antibiótico sulfato de gentamicina (SG) e o anestésico local cloridrato de lidocaína (CL). Esses fármacos são comuns nesses estudos, devido à restrição do uso oral no caso da gentamicina ^{7,13} e à utilização como anestésico padrão para determinação de potência de medicamento, no caso da lidocaína.

A velocidade de degradação do cimento é dosada pela reação com o tecido vivo e pela difusão de líquido no interior da matriz de cimento, o que tem como consequência a administração da liberação do fármaco. Esse fenômeno se dá, dentre outros fatores, devido à porosidade e à velocidade de difusão do fármaco e possibilita um controle da cinética de absorção do medicamento pelo

organismo. Cimentos mais porosos possuem maior velocidade de liberação, com maior efeito da explosão de liberação, que é um comportamento comum em liberação de fármacos ^{3,9,14}.

A determinação da quantidade de medicamento liberado da matriz de cimento, pode ser obtida por diversos métodos. Dentre eles tem-se a Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível (UV-Vis) ^{9,15-19}, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (sigla em inglês HPLC) ²⁰⁻²² e a Imunofluorescência por Polarização (sigla em inglês FPIA), ^{23,24}. A cinética que controla a liberação dos fármacos é obtida através da aplicação de modelos matemáticos e análise dos parâmetros obtidos nesses modelos, para determinação do melhor modelo, do qual se obterá qual é o mecanismo de liberação que prevalecerá. Entre os diversos modelos existentes, tem-se o modelo de Higuchi e de Peppas-Sahlin ^{3,9,25,26}.

Tendo em vista as restrições dos métodos convencionais e a sensibilidade e possibilidade de medições com certa rapidez, a espectroscopia de impedância eletroquímica (sigla em inglês EIS) é utilizada neste trabalho como ferramenta de estudo da liberação de fármacos em solução. Essa técnica já é bastante utilizada em caracterizações de materiais que necessitam de propriedades elétricas específicas como, por exemplo, células fotovoltaicas ²⁷ e se mostra uma técnica promissora para determinação de quantidade de fármaco transportado, através do organismo, durante o processo de liberação.

Um estudo prévio desenvolvido por Colpo *et. al.* ²⁸ possibilitou a utilização da EIS como técnica para caracterização elétrica de amostras de soluções desconhecidas, já buscando essa correlação entre propriedades elétricas e gradiente de concentração da solução. Esse foi o único trabalho encontrado que trata da utilização da EIS como método para determinação do perfil de liberação de fármacos. Em complemento a esse trabalho, o presente estudo busca a determinação do perfil de liberação de fármacos, assim como ocorre quando da utilização das técnicas convencionais de determinação de concentração de fármacos em testes de liberação.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Utilização da técnica de EIS no acompanhamento dos fenômenos relacionados ao processo de liberação de fármacos.

2.2 Específico

- Obter célula eletroquímica que permita realizar testes de liberação *online* com acompanhamento por medições de impedância;
- Realizar o estudo da técnica de medição de liberação de fármacos por EIS de forma a permitir sua padronização;
- Obtenção do circuito equivalente que representa as interações entre solução tampão, fármacos e matriz cimentícia;
- Determinar as diferenças entre resultados de liberação de fármacos para medições por EIS e por UV-Vis;
- Determinar vantagens e desvantagens de medições para liberação de fármacos entre os métodos EIS e UV-Vis;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Biomateriais possuem várias definições que vão desde as mais abrangentes até as mais específicas. A busca por consenso em relação à definição de biomateriais é relativamente nova, em comparação com o desenvolvimento da ciência moderna. Uma das mais antigas definições é creditada a Park²⁹ e trata o biomaterial como uma substância inerte farmacologicamente e sistemicamente projetada para implantação ou incorporação em sistemas vivos. Nessa definição o biomaterial é tido como um implante, porém o uso do prefixo *bio* tornou-se mais amplo com o crescimento de sua utilização, sendo empregado em terminologias de outras áreas, como é o caso das palavras biodegradável ou biofísica, por exemplo.

Durante a Conferência de Consenso em Biomateriais em 1982, biomaterial foi definido como “Qualquer substância (exceto drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que pode ser utilizada por algum período de tempo, como todo ou parte de um sistema para tratar, ampliar ou substituir algum tecido, órgão, ou função do corpo”³⁰.

Na definição proposta posteriormente por Williams³¹, biomateriais são tidos como materiais não biológicos utilizados em dispositivos médicos, com intuito de interagir com sistemas biológicos.

Outra definição do próprio Williams classifica biomateriais como substâncias projetadas para obter uma forma que, sozinhas ou como parte de um sistema complexo, são usadas para direcionar, pelo controle de interações com os componentes do sistema vivo, o curso de algum procedimento terapêutico ou de diagnóstico, em medicina veterinária ou medicina humana³². Esta correção foi sugerida pelo autor, devido às variações que o termo biomateriais sofreu com o passar dos anos e o aumento do uso da palavra como comentado no primeiro parágrafo deste capítulo.

Em outra definição, Jaganathan *et. al.*³³ apresenta os biomateriais como materiais empregados com eficiência na substituição, suporte e reparo de

algumas partes do corpo humano e suas funções. Essa definição abrangente possibilita a inclusão de materiais externos ao corpo como pinças, agulhas e bisturis.

De acordo com Pires *et. al*³⁴, biomateriais são dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos, com aplicações diversas, como vacinais, cirúrgicas, entre outras. Ainda nessa definição, biomaterial foi deliberado como material de origem sintética ou natural, incluindo materiais naturais quimicamente modificados como géis, pastas ou líquidos, podendo ser também adaptados e não somente fabricados como na maioria dos casos.

De acordo com a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, os biomateriais são definidos como materiais passíveis de associação a outras substâncias, como por exemplo, fármacos e excipientes, e, nessas condições, podem apresentar riscos à saúde dos usuários³⁵. O risco, atrelado aos biomateriais associados, está relacionado ao excesso nas dosagens dos materiais que se ligam a eles, podendo provocar efeitos colaterais comuns em casos de superdoses de medicamentos, por exemplo³⁵.

A composição química é um ponto de elevada importância na classificação de um material como biomaterial, influenciando na resposta que esse material apresentará durante o contato com o tecido vivo, ou seja, o comportamento biológico do biomaterial.

3.1.1 Biocompatibilidade e Biofuncionalidade

A biocompatibilidade se define como a tolerância do tecido envoltório aos biomateriais e aos produtos gerados durante a interação entre tecido e material³⁶. Sendo assim, tem-se a biocompatibilidade como uma condição obrigatória para o emprego de um biomaterial em um tecido vivo. Nem o biomaterial, nem seus possíveis derivados, provenientes das interações tecido/implante, podem provocar danos ao organismo, independente do tempo de exposição do material ao tecido⁶.

Além da necessidade de evitar danos derivados da interação entre material e/ou seus produtos com o organismo, o biomaterial deve possuir uma finalidade específica, realizando a função da parte do corpo que está

substituindo, ou seja, possuir biofuncionalidade. Essa habilidade é bastante influenciada pelo contato entre fluidos corpóreos e implante, uma vez que determinados ambientes são altamente nocivos, podendo levar o biomaterial a uma degradação indesejada e, por consequência, reduzir ou eliminar sua biofuncionalidade ^{33,37}.

3.2 Classificação dos Biomateriais

Os biomateriais podem ser classificados quanto à sua origem, quanto à reação biológica, quanto à características físicas e quanto à propriedade biológica ³⁷.

3.2.1 Classificação Quanto à Origem

Nessa classificação, os biomateriais se dividem em dois subgrupos chamados de biomateriais artificiais e biomateriais naturais (biológicos). Essas subdivisões dão origem a mais ramificações. Nos biomateriais artificiais existem os obtidos de fontes poliméricas, metálicas, cerâmicas, e também existe o grupo dos compósitos, que inclui como componentes do mesmo, mais de um tipo de material dos três supracitados.

Em se tratando dos produtos oriundos de fontes naturais, uma das subdivisões é a que dá origem ao conjunto dos autógenos, que nada mais é do que o grupo composto pelos materiais oriundos de tecido do próprio paciente. Além desse grupo, existem os materiais alógenos ou homógenos e xenógenos.

- Nos biomateriais autógenos, tecidos são retirados de partes do corpo e enxertados em outros locais. Assim, esses biomateriais são mais indicados para esse tipo de intervenção por possuírem maior biocompatibilidade ^{37,38}. São fundamentais em aplicações relacionadas à osteogênese, onde é necessária uma matriz autógena para proporcionar o transplante de células vivas para a região receptora ³⁷. As propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas, dos materiais autógenos, tornam esse material altamente indicado para aplicações como enxerto, sendo o mais indicado entre os tipos de enxertos.

- Biomateriais xenógenos são aqueles obtidos de doadores de outras espécies, frequentemente de fontes bovinas e suínas, fornecendo válvulas cardíacas, dentre outros materiais.

Analisando o grupo dos biomateriais artificiais ou sintéticos, como já mencionado, este é dividido em metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos^{39,40}. Esses materiais são definidos como implantes e atuam no preenchimento de vazios causados por defeitos ósseos, além de servirem de suporte para crescimento de novo tecido, sem que se tenha incorporação fisiológica, dentre outras funções⁴¹.

Os biomateriais metálicos são compostos de metais e suas ligas e são geralmente utilizados como componentes estruturais em locais de alto esforço mecânico, em que se necessita de resistência mecânica elevada como, por exemplo, articulações. Eles podem ser divididos em três grupos dominantes; são eles os aços inoxidáveis, ligas cromo-cobalto-molibdênio e titânio e suas ligas. Os biomateriais metálicos possuem excelente condutividade elétrica e térmica, propriedades mecânicas apropriadas, boa resistência à corrosão, custo razoável, fácil processamento e bom acabamento^{34,39,40}. As aplicações mais usuais dos biomateriais metálicos incluem próteses para substituição de articulações, fixação de fraturas, confecções de válvulas cardíacas artificiais e stents, cirurgias maxilo-faciais e bucais, dentre outras aplicações^{40,42,43}.

Os biomateriais poliméricos são de origem artificial nesse caso, mas podem ocorrer também biopolímeros de origem natural. Eles se diferem entre si pelo método de obtenção, sendo os polímeros naturais obtidos através de fontes naturais e os polímeros sintéticos obtidos através de polimerização^{34,37}. Os polímeros possuem como vantagem a maior conformabilidade, o que proporciona um processamento em geometrias complexas, diferentemente do que acontece com os materiais metálicos e cerâmicos. Esses materiais são compostos de macromoléculas de alta massa molecular em sua estrutura que se formam devido à ligação dos chamados meros (unidades repetitivas menores). Essas macromoléculas possuem ligações mais estáveis quando obtidos por polimerização, em comparação com a obtenção de organismos vivos, o que é tido como uma característica importante para o uso de polímeros

como biomateriais, por minimizar a degradação polimérica, que pode levar à reação de rejeição desse biomaterial^{34,39}. Sua tolerância biológica foi reportada pela primeira vez em 1969 por Hodosh³⁹. As maiores utilizações de polímeros no âmbito de reparo de tecidos vivos são do ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ácido polihidroxibutirato (PHB) e a policaprolactona (PCL)³⁷. A Figura 1 mostra os locais onde os biopolímeros são mais utilizados.

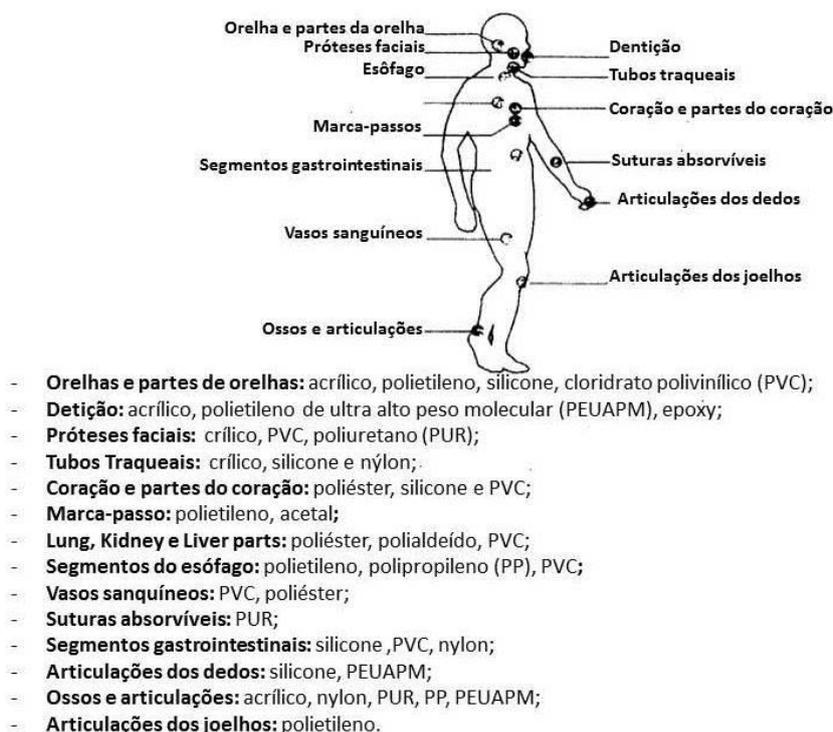


Figura 1 - Aplicações médicas comuns e tipos polímeros usados em medicina. Adaptado de REFOJO, 1996⁴².

Os materiais cerâmicos se encaixam no terceiro grupo e são chamados de biocerâmicas³⁹. Esses biomateriais possuem alta resistência ao desgaste, porém são menos dúcteis, o que resulta em uma maior fragilidade, levando a um rompimento com pouca deformação plástica (quando ocorre)^{34,39,40}. Diferentemente do que acontece nos metais, em que os íons estão livremente espalhados, nas cerâmicas os elétrons se encontram entre os íons e átomos e isso leva a uma baixa condutividade elétrica e térmica^{34,39}. As aplicações dos materiais cerâmicos para fins médicos são diversas, podem ser para instrumentação de diagnósticos, válvulas cardíacas, preenchimento ósseo, para aplicações em ortopedia e odontologia, dentre outras. Os biocerâmicos são indicados para aplicações que requerem resistência ao ataque microbial, à

mudanças de pH e de temperatura ⁴². Nesse grupo se encontram os cimentos de fosfato de cálcio, que são amplamente utilizados como biomateriais por possuir interessante biocompatibilidade e não causar reação adversa no contato com o organismo vivo ³⁷.

Biomateriais compostos de fosfato de cálcio (CaP) são indicados para recobrimento de outros tipos de biomateriais metálicos e poliméricos, que não possuem a biocompatibilidade que ele possui, assim o ancoramento de um implante é mais eficiente. A melhor fixação reduz a movimentação do implante, o que diminui a ocorrência de desprendimento de material não desejado no organismo ⁴⁴.

3.2.2 Classificação Quanto à Reação Biológica

Na classificação quando à reação biológica do biomaterial, este pode ser biotolerável, bioinerte, bioativos e absorvíveis ^{3,6,44}.

- Os biomateriais toleráveis são aqueles que, quando em contato com o organismo, promovem a formação de uma camada de tecido fibroso que os envolve mantendo esse material isolado da vizinhança. Essa camada é tida como a resposta do tecido á presença do biomaterial. Quanto maior a espessura da camada, maior será a rejeição do tecido adjacente ao biomaterial.
- Biomateriais inertes são aqueles em que se tem contato entre biomaterial e tecido sem que haja formação ou com mínima formação de material fibroso, ou seja, possuem mais estabilidade química em comparação com o anterior. Apresentam uma resposta fagocítica passageira, culminando numa fina camada fibrosa.
- Biomateriais ativos são aqueles em que se tem a osteointegração, ou seja, o tecido e o material se ligam quimicamente devido à similaridade que existe entre os elementos que os compõem. Um bom exemplo é a hidroxiapatita, que possui relação Ca/P igual a 1,67, assim com ocorre nos minerais ósseos. A ligação entre tecido ósseo e material leva a osteoindução (será discutida na seção 3.2.4), através do recobrimento por células ósseas. Além

da hidroxiapatita também são bioativos os compostos de fosfato de cálcio, vidros e vitro-cerâmicas à base de fosfato de cálcio;

- Biomateriais absorvíveis são aqueles que, com o contato com o tecido vivo e com o passar do tempo, sofrem degradação, solubilização ou fagocitose, sendo absorvidos pelo organismo. Esses materiais possuem, como vantagem, a eliminação da necessidade de intervenção cirúrgica para retirada do material, já que o próprio organismo se encarrega de sua eliminação. Além disso, essa característica possibilita o uso desses materiais como matrizes para incorporação de fármacos, que podem ser liberados no organismo durante absorção do biomaterial pela interação tecido/material.

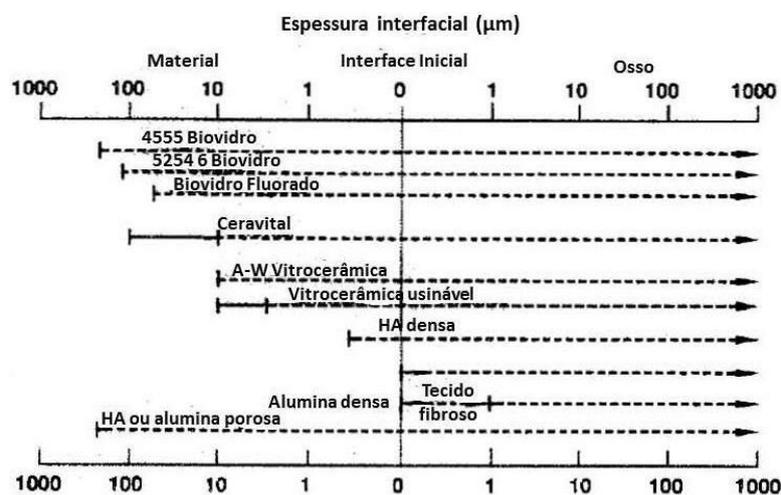


Figura 2 - Comparação da espessura da camada de reação do implante bioativos de tecido fibroso de biocerâmicas inativas em ossos. Adaptado de HENCH, 1991⁴⁵.

Na Figura 2 é possível verificar as espessuras das camadas formadas devido à reação do implante em contato com o tecido vivo. Na comparação estão alguns biomateriais cerâmicos e as respectivas espessuras da camada de reação ao implante. No caso dos biomateriais metálicos, poliméricos e cerâmicos ocorre uma variação na resposta, mesmo dentro de cada grupo. A Tabela 1 mostra as respostas biológicas comuns em alguns tipos de biomaterial.

Tabela 1 - Implantes de materiais classificados com base no tipo de material utilizado e na resposta biológica que eles provocam quando implantados. Adaptado de SAINI, 2015 ³⁹.

Implantes podem ser classificados com base no tipo de material utilizado e na resposta biológica que eles incitam quando implantados			
Atividade Biodinâmica	Composição química		
	Metals	Cerâmicos	Polímeros
Biotolerável	Ouro Ligas Co-Cr Aço Inoxidável Nióbio Tântalo		Poliétileno Poliâmida Polimetilmetacrilato Poli tetrafluoretileno Poliuretano
Bioinerte	Titânio comercial puro Liga de titânio (Ti-6Al-4U)	Óxido de Al Óxido de Zircônia	
Bioativo		Hidroxiapatita Fosfato tricálcico Biovidro Carbono-silício	

3.2.3 Classificação Quanto às Características Físicas

Nessa classificação, os materiais são divididos em inorgânicos ou mineralizados e desmineralizados. Nos materiais inorgânicos ocorre a remoção dos componentes orgânicos através de processo químico. Esse processo gera uma matriz inorgânica na forma de grânulos de dimensões variadas ³⁷. No caso dos materiais desmineralizados, o processo químico retira os componentes inorgânicos e celulares restando assim a matriz extracelular ³⁷.

3.2.4 Classificação Quanto à Propriedade Biológica

A classificação quanto à propriedade biológica divide os biomateriais em osteogênicos, osteoindutores, osteopromotores e osteocondutores. A divisão leva em conta o mecanismo de ação em cada tipo de biomaterial.

- Na osteocondução promove o crescimento ósseo através da sustentação de células. O material, que geralmente é inorgânico, atua como orientador da proliferação das células, permitindo a deposição da célula óssea que leva ao crescimento da mesma. Como resultado, ocorre a formação de células osteoprogenitoras ⁴⁶.
- A osteoindução é tida como a capacidade de induzir células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos ⁴⁷. Essas células se tornam diferenciadas graças à ação dos agentes indutores e dão origem às células osteoprogenitoras que, por sua vez, formam o novo osso, culminando no processo de indução ⁴⁸.

- Osteopromoção é a habilidade de promover a separação de células de acordo com suas características. Durante a regeneração guiada do tecido, os osteopromotores atuam controlando a presença dos fibroblastos e dos osteoblastos na região do defeito ósseo, devido à maior facilidade de proliferação do primeiro em detrimento do segundo. Basicamente, provocam através de meios fisiológicos, como membranas ou barreiras, o isolamento anatômico de uma região, com isso permite a proliferação e seleção de certas células (osteoblastos preferencialmente) e impedem a ação de inibidores do processo regenerativo ³⁷.
- Osteogênese: é a habilidade (geralmente de materiais orgânicos como autógenos) de incentivar a formação de tecido ósseo, através de osteoblastos. A regeneração óssea é resultado da ação de osteoblastos endósseos e de células provenientes da medula e transferidas juntamente com o enxerto ³⁷.

3.3 Biocerâmicos

A utilização de cerâmicas como biomateriais possui registros do final do século XIX, quando Dreesman relatou a utilização de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) como possível substituto ósseo ³⁷. Na segunda metade do século XX, a utilização de biocerâmicas teve um foco diferenciado. O objetivo era promover a mínima ou nenhuma reação do tecido, ou seja, sem interação com o meio envoltório. No entanto, com o passar dos anos e o desenvolvimento de diversas pesquisas, que proporcionaram maior entendimento sobre as propriedades desses materiais, o foco se voltou para uma proposta no caminho oposto, buscando cada vez mais interação tecido/biocerâmica para promover geração de tecido ósseo com preferência de ligações íntimas nessa interface ⁶. Tendo essa necessidade como impulso, em 1969, Hench apresentou um vidro que seria utilizado como biomaterial e possuía como característica a capacidade de atrair células ósseas. Essa descoberta culminou na criação de uma nova classe de biomateriais conhecida como biocerâmicas ³⁷.

As biocerâmicas são utilizadas em um amplo leque de especialidades médicas. Esta variada gama de atuação é possível graças às propriedades

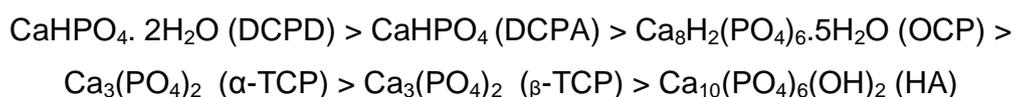
cristalográficas e à compatibilidade química, em meio fisiológico, que as cerâmicas possuem. Alguns exemplos de utilização de materiais cerâmicos em medicina estão em instrumentos de diagnóstico, próteses ortopédicas, traqueias artificiais, válvulas cardíacas e preenchimento ósseo^{32,34}. As ligações nos materiais cerâmicos são do tipo iônicas e/ou covalentes. Elas formam estruturas cristalinas tridimensionais com alto grau de compactação, o que proporciona uma maior fragilidade a esses materiais quando da presença de trincas ou de outros defeitos. Essa característica limita o uso de biocerâmicas, inviabilizando sua aplicação em ambientes onde se observa maior concentração de tensões e que exijam maior poder de sustentação do implante^{34,49}. Dentre as aplicações mais comuns, biocerâmicas são indicadas para composição de articulações de próteses e crescimento ósseo, devido ao seu baixo coeficiente de atrito³⁷.

As biocerâmicas podem ser divididas em diversos grupos de acordo com sua interação com o tecido. De modo geral, os grupos são das cerâmicas bioinertes e cerâmicas bioativas³⁷. Como exemplos de cerâmicas bioinertes aparecem alumina (Al_2O_3), zircônia (ZrO_2) e dióxido de titânio (TiO_2). Já no grupo de cerâmicas bioativas, ou seja, que induzem uma atividade biológica, encontram-se a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), que fazem parte do grupo dos fosfatos de cálcio e o biovidros.

3.3.1 Fosfato de Cálcio

Os fosfatos de cálcio (CaP's) são classificados como pertencentes a um grupo de materiais cerâmicos que possuem grande importância na área dos biomateriais^{2,4,6,8,50,51}. Essa importância é justificada pela presença de elementos nesses materiais, que também são encontrados no constituinte mineral de ossos e dentes, proporcionando assim maior biocompatibilidade entre biomateriais feitos de CaP's e dentes e ossos, ou seja, existe uma similaridade química entre esses materiais e o constituinte mineral de ossos e dentes^{2,8}. Juntamente com essa característica, os CaP's também possuem

boa bioatividade e capacidade de ser reabsorvido pelo organismo, o que leva à utilização desses materiais em intervenções voltadas à recuperação ou substituição de tecido ósseo ^{3,14,50,52,53}. A bioatividade dos fosfatos de cálcio é definida como ligação entre a interface de contato biomaterial/osso, que leva a uma interação química e proporciona a formação de uma camada fina composta de apatita biológica na superfície ⁵⁴. A biocompatibilidade, já mencionada anteriormente, se dá pela proximidade de composição entre os valores da relação CaP's e tecido ósseo e dentes humanos ². A reabsorção, por sua vez, ocorre pela degradação que o biomaterial sofre, possibilitando a formação de um novo tecido ósseo, o qual se instala no local antes ocupado pelo implante e favorece a adesão e proliferação de osteoblastos, através de um molde ou padrão ⁸. De modo genérico, os biomateriais cerâmicos possuem uma ordem de degradação como segue:



Essa degradação é consequência da reabsorção do material, que se relaciona com o pH do meio fisiológico, com o produto da solubilidade, além de fatores biológicos como presença de leucócitos, dentre outros ³⁷.

Além da proporção Ca/P já citada (seção 3.2.2), existem outras características que são também importantes nos CaP's, Uma delas é o caráter ácido ou básico, que é consequência da interação entre os reagentes utilizados na formação do fosfato, de acordo com a regra de interação ácido-base ^{6,50}. Nessa interação, uma menor quantidade de cálcio, em comparação com o fósforo, acarreta em maior acidez do produto formado e uma maior solubilidade do fosfato de cálcio em soluções aquosas, ou seja, tem-se uma maior solubilidade para os fosfatos em meios ácidos e menor solubilidade em meios alcalinos ⁸. A figura 3 mostra a relação entre a solubilidade e o tipo de fosfato de cálcio.

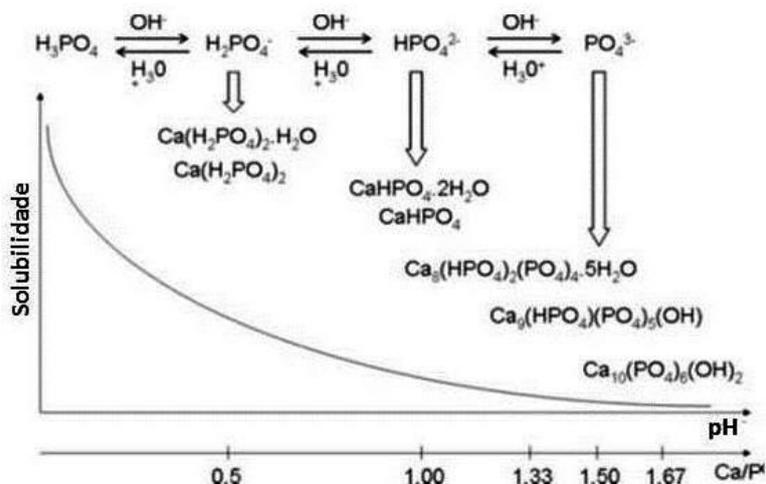


Figura 3 – Variação da solubilidade em água de vários fosfatos de cálcio obtidos por ácido fosfórico neutralizado em relação à relação cálcio e fósforo (Ca/P). Adaptado de LEÓN, 2009⁵⁵.

Além de cálcio e fósforo, os biomateriais de compostos de fosfato de cálcio também podem apresentar água incorporada, hidrogênio e, obrigatoriamente, apresentam oxigênio em sua composição⁵⁰.

Os ortofosfatos de cálcio existentes são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Ortofosfatos de cálcio existentes e suas propriedades. Adaptado de DOROZHKIN, 2017; LEÓN, 2009 e VÁSQUEZ, 2016^{8,50,55}.

RELAÇÃO Ca/P	COMPOSTO	FÓRMULA	SOLUBILIDADE a 25° C, - LOG(K _s)
0,5	Fosfato Monocálcico Monohidratado (MCPM)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	1,14
0,5	Fosfato Monocálcico Anidro (MCPA)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1,14
1,0	Fosfato Dicálcico Dihidratado (DCPD)	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	6,59
1.0	Dicalcium phosphate (DCPA)	CaHPO ₄	6.90
1,33	Fosfato octacálcico (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	96,6
1,5	α-Fosfato tricálcico (α-TCP)	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	25,5
1,5	β-Fosfato tricálcico (β -TCP)	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	28,9
1,2--2,2	Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	Ca _x H _y (PO ₄) _z ·nH ₂ O, n = 3–4,5; 15–20% H ₂ O	25,7 – 32,7
1,5 – 1,67	Hidroxiapatita Deficiente em Cálcio (CDHA)	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} (0 < x < 1)	~85
1,67	Hidroxiapatita (HA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	116,8
1,67	Fluorapatita (FA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	120,0
1,67	Oxiapatita (OA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ ⁰	~69

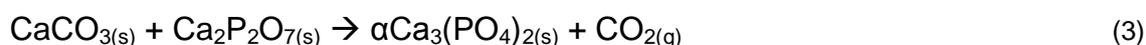
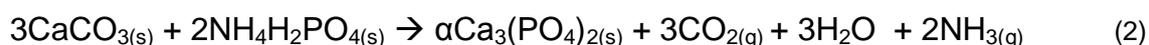
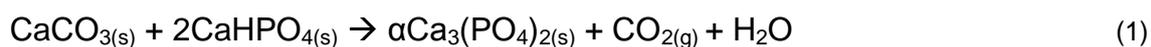
2,0	Fosfato Tetracálcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2^0$	38-44
-----	-----------------------------	--------------------------------	-------

Dentre as variações de CaP's, existem os cimentos de fosfato de cálcio como os mais biocompatíveis e dentro desse grupo encontram-se os fosfatos tricálcicos (α -TCP, α' -TCP, β -TCP e γ), sendo o α -TCP o mais comumente utilizado e que dá origem a CDHA (biomaterial reabsorvível) por uma reação de hidrólise^{8,56}.

3.3.1.1 α -TCP

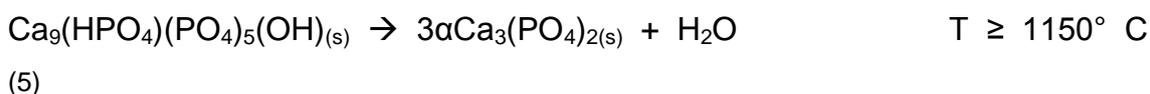
O α -TCP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] é um sal de fosfato tricálcico com uma estrutura monoclinica e relação Ca/P igual a 1,5. Essa fase se mantém estável no intervalo entre 1125° C e 1430° C, abaixo disso ocorre a formação de outro fosfato tricálcico também comum em aplicações médicas, o β -TCP (estrutura romboédrica) que é estável em temperaturas até 1125° C. A utilização do α -TCP é comum em aplicações na área da saúde, em especial na ortopedia devido a sua bioatividade^{7-9,37,57}. A densidade teórica desse sal é de 2,863 g/cm³⁸. Além dessas duas fases citadas, existe a fase α' -TCP, também conhecida como superalfa que é estável em temperaturas acima de 1430° C^{37,57} e a fase γ , que ocorre em elevadas pressões⁵⁸.

A obtenção de α -TCP é possível pelo aquecimento de compostos precursores aos níveis térmicos citados acima, contanto que esses compostos possuem íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} em sua composição e que a presença desses íons respeite a relação Ca/P igual a 1,5⁵⁷. Os precursores mais comumente utilizados na obtenção de α -TCP e os produtos obtidos do CaP em questão são mostrados nas equações 1, 2, 3 e 4 que seguem^{6,59}.





A equação 5 representa a transformação da hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) em α -TCP por decomposição térmica em temperaturas acima de 1150° C. Apesar de existirem outros métodos de obtenção dessa fase, essa, juntamente com a metodologia citada acima de aquecimento de precursores, que contenham íons de cálcio e fósforo (Ca^{2+} e PO_4^{3-}), está entre as mais utilizadas para obtenção de α -TCP⁸.



3.3.1.2 CDHA

A hidroxiapatita deficiente em cálcio é um fosfato de cálcio similar a hidroxiapatita biológica, com relação Ca/P variando entre 1,5 – 1,67, e é formada a partir da reação de hidrólise, comumente da fase α , sem que a relação Ca/P seja alterada^{3,8,37}.

A fase mineral de ossos e dentes é composta em sua maioria pela apatita biológica e, sendo a CDHA similar a esse mineral, ocorre interação química entre CDHA e matriz óssea, que culmina no favorecimento da proliferação de células como fibroblastos e osteoblastos⁸. A reação da equação 5 representa o inverso desse fenômeno⁸. O processo ocorre por dissolução com liberação de íons de cálcio e fósforo em solução, até que ocorra a supersaturação desses íons. Em seguida, acontece a precipitação ou nucleação da nova fase ao redor das partículas do pó de α -TCP e crescimento de cristais de CDHA, que se apresentam na forma de agulhas ou de placas petaloides^{3,6,7}.

A formação dos cristais de CDHA está diretamente ligada à cristalinidade do pó, que dá origem a esse material. Quanto maior a cristalinidade do pó, menor sua capacidade de dissolução e com isso, menor a concentração de Ca^{2+} e PO_4^{3-} durante a reação de pega, assim é possível reduzir a ocorrência de supersaturação desses íons¹⁹.

3.4 Cimento de Fosfato de Cálcio

O cimento de fosfato de cálcio (CFC) foi patenteado nos anos 80 por Brown e Chow (TTCP + DCPD + água) ⁶, descrito anteriormente por LeGeros *et al.* ^{3,50,56} e utilizado comercialmente pela primeira vez nos anos 90 para tratamento de defeitos maxilofaciais e fraturas ³. Esse cimento é formado pela combinação de um ou mais pós de ortofosfatos (fosfatos) de cálcio, misturados a uma solução aquosa, que pode ser solução tampão fosfato (sigla em inglês PBS), solução aquosa de ortofosfato de sódio ou água, dentre outras soluções aquosas possíveis ^{2,3,56,60}. Devido a sua habilidade de reparo, crescimento e regeneração óssea, as formulações de CFC são chamadas de cimento de fosfato de cálcio ósseo (CFCO) ². Este material possui também a importante característica de endurecer em contato com tecido vivo com baixas temperaturas de reação de pega, diferentemente dos cimentos acrílicos (muito utilizados em cirurgias ortopédicas), que liberam calor durante a cura devido à reação de polimerização ^{3,8}.

Os CFC's dão origem a basicamente dois produtos distintos, a CDHA - $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ e HA $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - ou a Brushita - $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - (DCPD). Para obtenção da DCPD ocorre uma mistura á seco de dois ortofosfatos de cálcio distintos, um básico e um ácido, buscando um endurecimento da pasta cimentícia por reação ácido-base; ou ainda uma mistura de fosfato de cálcio com um ácido (H_3PO_4). Já na obtenção da CDHA a pega ocorre por reações de hidrólise do pó cimentício que promove o endurecimento do material como observado anteriormente (vide seção 3.3.1.2) ^{8,37}.

A mistura do pó de fosfato de cálcio com a solução aquosa produz uma pasta moldável e viscosa, que se torna uma massa firme em poucos minutos. Quando a massa está rígida o suficiente, ela pode ser colocado no local do defeito substituindo o osso danificado e possibilitando um manuseio rápido e prático na mesa de cirurgia ².

A porosidade desses cimentos varia entre 30% e 50% dependendo das condições de processamento aplicadas. A relação líquido/pó (L/S) utilizada tem

efeito direto sobre a porosidade do cimento, enquanto que o tamanho das partículas dos pós misturados inicialmente influencia no formato dos grãos. Esses grãos podem ser na forma de agulhas ou de placas petaloideas, sendo os cristais no formato de agulhas obtidos com grãos mais finos e os formatos de placas, obtidos com grãos grosseiros. A Figura 4 representa essas relações e as consequências das variações das mesmas ^{3,8,61}.

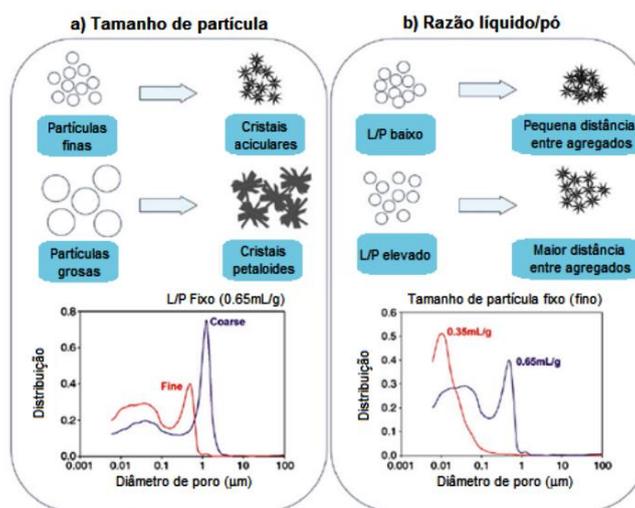


Figura 4 - Influência do tamanho de partícula e a razão L/P na porosidade intrínseca do CFC.
Fonte: VÁSQUEZ, 2016 ⁸.

Algumas das principais vantagens do cimento de fosfato de cálcio são:

- Contato osso e implante satisfatório;
- Biocompatibilidade, bioatividade, osteoindução e osteogênese;
- Não necessita de que a cavidade seja moldada;
- Mínima cavidade;
- Preparação realizada durante o procedimento cirúrgico ^{6,62}.

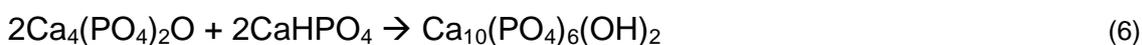
A biocompatibilidade do CFC, juntamente com outras propriedades como estequiometria variável, biofuncionalidade, propriedades de dissolução, porosidade intrínseca, além de sua reação de pega, sem liberação de calor, tornam esse material uma matriz interessante para transporte de medicamentos em processos de liberação controlada de fármacos ^{3,7,62}.

A principal desvantagem do cimento de fosfato de cálcio é sua baixa resistência mecânica, que limita sua aplicação à locais de pouca solitação ^{3,5,25}. Seu endurecimento ocorre por processos de dissolução do pó cimentante, seguido de precipitação de um DCPD ou CDHA. Nesse processo ocorre a

dissolução de íons de fósforo e de cálcio como mencionado na seção 3.3.1.2, culminando num processo de nucleação e crescimento de nova fase com a morfologia característica ^{3,8}.

3.4.1 Cimentos Apatíticos

Os cimentos apatíticos são chamados assim, porque seus produtos finais são a hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 - HA]$ ou a CDHA $[Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)]$, sendo a HA é obtida por reação ácido-base mostrada na Eq. 6 e a CDHA é obtida pelo inverso da reação da Eq. 5, mostrada na seção 3.3.1.1 ^{3,8,63}.



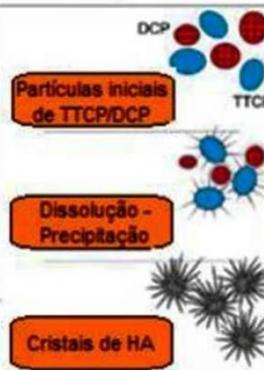
Cimento apatítico		
	Único componente	Múltiplos componentes
Reativos	α -TCP	TTCP + DCPA/DCPD
Reação	$3\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	$2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O} + 2\text{CaHPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Tipo de reação	Hidrólise	Ácido - Base
Mecanismo de pega e morfologia cristalina	 <p>Partículas iniciais de α-TCP</p> <p>Dissolução - Precipitação</p> <p>Cristais de CDHA</p>	 <p>Partículas iniciais de TTCP/DCP</p> <p>Dissolução - Precipitação</p> <p>Cristais de HA</p>

Figura 5 - Características dos cimentos apatíticos. Adaptado de VÁSQUEZ, 2016 ⁸.

A hidrólise que ocorre na formação da CDHA, como pode ser vista a esquerda da Figura 5, leva a um produto com menor grau de cristalinidade se comparada com a HA estequiométrica. Sua alta biocompatibilidade se justifica pela similaridade estrutural entre CDHA e apatita biológica encontrada em ossos e dentes ^{3,8}.

3.4.2 Cimentos de α -Fosfato Tricálcico

O cimento de α -fosfato tricálcico (α -TCP)^{3,6,8,64} é um cimento de grande importância, por formar como produto um fosfato de cálcio semelhante à hidroxiapatita biológica, além de possibilitar reação de pega em temperaturas próximas às temperaturas do corpo humano^{8,37}. A hidratação do cimento α -TCP, para obtenção da hidroxiapatita deficiente em cálcio, foi descrita pela primeira vez por Monma e Kanazawa (1976), que realizaram testes de variação de temperatura e pH durante a reação de hidrólise⁶⁵. O controle da cinética de reação é obtido através da variação de parâmetros mencionados (tamanho de poros, relação L/P e composição química da fase líquida) e também pela utilização de diferentes aditivos no líquido, os quais promovem a redução do pH e, conseqüentemente, o aumento da dissolução do pó do cimento⁸.

A hidrólise está ligada inicialmente à área superficial do pó de cimento. Após a formação dos primeiros cristais de CDHA, esses passam também a interferir na reação de hidrólise. Cristais que envolvem por completo o grão, formando uma camada espessa, dificultam o processo de difusão do líquido, influenciando assim na reação de hidrólise. A aceleração da difusão de líquido ocorre quando a camada de CDHA é descontínua, fina e possibilita a passagem de íons⁸.

3.5 Cimentos de Fosfato de Cálcio como Sistema de Liberação de Fármacos

As rotas de administração de medicamentos encontradas como opções em tratamentos podem ser sistêmica, oral (mais usual) ou local, como mostrado na Figura 6. A busca por meios eficientes de administração de medicamentos levou a utilização de biomateriais como formas de controle das concentrações terapêuticas em um tratamento⁶⁶.

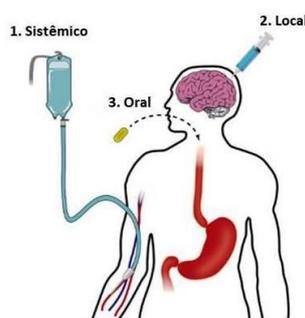


Figura 6 - Rotas de administração de medicamentos. Adaptado de TIBBITT *et. al.* 2016⁶⁶.

Os cimentos de fosfato de cálcio são muito indicados como meios de transporte de medicamentos e alvo de diversos estudos, com intuito de melhorar as propriedades desses biomateriais, buscando a ampliação de sua utilização no campo de liberação controlada de fármacos ^{3,14,19,25,46,51,61,67-69}. Esse biomaterial, com incorporação de medicamentos, é indicado para tratamento de enfermidades como osteomielite, tumores ósseos e osteoporose, dentre outras doenças que atacam o tecido ósseo ^{5,19,46}.

A escolha desse cimento para aplicações locais de medicamentos, é interessante devido às suas propriedades (biocompatibilidade, bioatividade, osteocondução, osteogênese, bioabsorção), além de possuir porosidade adequada para essas aplicações, habilidade de incorporar drogas, mantê-las num determinado espaço em sua estrutura e liberar a substância controladamente ^{3,19,46}. Outro fato muito importante, já mencionado anteriormente, é a temperatura de cura do CFC que é baixa (reação de pega ocorre em temperatura ambiente), o que reduz o risco de inflamação no local onde o biomaterial é aplicado, risco esse que é maior durante a reação de polimerização do cimento acrílico ^{3,7,8,62,70-72}.

3.5.1 Porosidade

Um destaque especial deve ser dado à relação entre porosidade e difusão de fármacos, por ser um parâmetro fundamental no controle da cinética de liberação de medicamentos. Porém, essa mesma porosidade limita o uso desse cimento em locais onde se fazem necessárias aplicações de cargas elevadas ^{3,61 9,46}. Os parâmetros relevantes na porosidade que possuem grande peso na eficiência da liberação de fármacos incorporados em CFC são:

- (i) a porcentagem de porosidade total;
- (ii) o tamanho dos poros, sendo classificados em macroporos ou microporos;
- (iii) a conectividade dos poros que leva em consideração a presença de canais entre os poros, assim como sua quantidade e distribuição na matriz;

(iv) o formato dos poros ⁴⁶.

O controle da porosidade na matriz cerâmica está diretamente relacionado à quantidade de líquido utilizado durante a preparação da pasta. Uma relação L/P maior acarreta em maior presença de poros no cimento obtido ⁶¹. Logo é possível concluir que uma maior relação L/P culmina numa aceleração na velocidade de liberação de medicamento em um sistema de liberação de fármacos. Além desse fator, o aumento da presença de poros abertos e aumento do diâmetro dos poros também elevam a taxa de difusão dos fármacos, levando a uma cinética de liberação mais acelerada ⁴⁶.

A microporosidade (tamanho de poros $\leq 10 \mu\text{m}$), que possibilita uma maior incorporação de fluidos corpóreos, pode ser controlada durante o processo de sinterização, com tamanho dos poros dependente da composição do material e do ciclo térmico utilizado ⁵¹. Já a macroporosidade (tamanho de poros $\geq 100 \mu\text{m}$) possibilita o armazenamento de colônias de células. O tamanho dos macroporos pode ser controlado pela adição de substâncias orgânicas, como por exemplo, naftaleno e partículas de sucrose, que sublimam ou calcinam em ambientes de altas temperaturas ^{51,64,73}.

A conectividade, assim como a morfologia, tamanho e quantidade de poros é fundamental para manter as moléculas de drogas dentro da matriz, até que essa entre em contato com os fluidos corpóreos ⁴⁶.

Para diferentes morfologias de poros em uma matriz, ocorrem alterações na cinética de liberação e serão encontrados padrões de liberação diferentes. A forma dos poros pode ser alterada devido à absorção de CFC, ou ainda pela formação de CDHA na superfície do cimento ou no interior dos poros ^{61,63}.

3.5.2 Cinética de Liberação

A área superficial, que está ligada à porosidade da matriz, é de grande importância durante a liberação. Ela é variável determinante na quantificação de fármaco liberado em um determinado intervalo de tempo em estudos de cinética de liberação. A lei de Higuchi, uma das mais conhecidas para determinação de cinética de liberação de medicamentos em testes de

liberação, é válida para os primeiros 60% de medicamento liberado em solução durante teste. A Equação 7, utilizada, nos casos em que a liberação ocorre de acordo com a Lei de Higuchi, tem como uma de suas variáveis a área superficial da matriz ^{3,7,9,14,19,61}.

$$M_t = A \cdot M_0 [DC_s(2C_0 - C_s)t]^{1/2} \quad (7)$$

Onde M_t é a quantidade de fármaco liberado por tempo t ; M_0 é a quantidade total de medicamento; A é a área superficial da estrutura; D é o coeficiente de difusão da matriz; C_s é a solubilidade de fármaco na matriz; C_0 é a concentração inicial de fármaco na matriz ^{9,14,25,61}. Existem outros modelos que buscam explicar a cinética de liberação de fármacos por outros fenômenos, sendo que para determinar a cinética de liberação mais adequada, para o sistema estudado, é preciso utilizar vários modelos e comparar os parâmetros, verificando qual deles é o mais aceitável, levando em consideração requisitos pré-determinados de validação ^{25,26}.

O cimento de fosfato de cálcio, utilizado com incorporação de medicamentos, funciona como um limitante da quantidade de fármaco liberada no local onde a intervenção se faz necessária. Assim, é possível evitar quantidades acima do necessário, que poderiam causar efeitos colaterais danosos ao paciente, ou doses abaixo da concentração inibitória mínima (sigla em inglês MIC), que culminariam em um tratamento ineficaz ^{7,19,61,67,68}.

Resumidamente, a matriz cimentícia é tida como regulador da liberação do fármaco, a qual tem relação direta com a microestrutura do cimento, taxa de degradação do fosfato de cálcio, solubilidade do medicamento e ainda com a natureza das interações entre matriz e fármaco ^{3,46}. Outro fator de alta relevância, na difusão de fármaco, é o fato de que a matriz possui uma velocidade de degradação consideravelmente menor, em comparação com a taxa de liberação do fármaco, o que justifica o controle da liberação de fármaco ser principalmente pelo processo de difusão através da matriz de cimento ^{3,14}.

Um fenômeno comum, durante a liberação de muitos fármacos, ocorre nas primeiras horas do contato entre tecido e biomaterial. Nos primeiros momentos, a quantidade de fármaco liberado é relativamente alta, devido à maior área

superficial em contato com líquido, sendo esse efeito mais expressivo em biomateriais com porosidade elevada. Trata-se da liberação da grande parte do fármaco, proporcionando quantidades elevadas do medicamento em contato com os fluidos corpóreos e provocando um fenômeno chamado de explosão de liberação ⁴⁶. A Figura 7 mostra um perfil típico de liberação variando com o tempo.

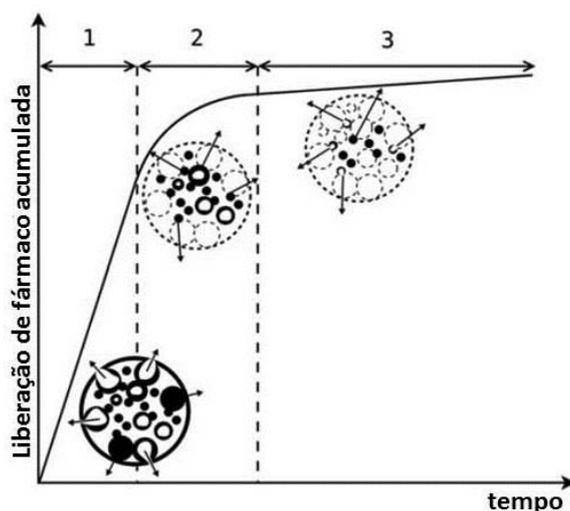


Figura 7 - Três regiões de uma curva típica de cinética de liberação de fármacos. Adaptado de PARENT, 2017 ⁴⁶.

Vale lembrar que nem todos os perfis seguem esse comportamento, podendo se alterar de acordo com as variáveis já citadas ou ainda por outros parâmetros não mencionados, mas que são também importantes e que mudam dependendo do sistema de liberação estudado ^{9,24,69,74}.

3.6 Fármacos

Os fármacos incorporados em matrizes, para liberação controlada, são de vários tipos. Dentre os vários grupos de medicamentos com aplicações específicas, existem os grupos dos antibióticos que controlam o crescimento e eliminam bactérias; e os anestésicos locais, que inibem a dor por determinados períodos. No grupo do antibiótico, dentre os mais comuns, encontram-se a vancomicina, a quinolona, as penicilinas e o sulfato de gentamicina. Esses fármacos são aplicados de formas variadas, dependendo do seu efeito

colateral e da forma como se apresentam quando da administração em tratamentos ⁷⁵.

Nos grupos dos anestésicos locais (AL) pode-se citar a EMLA (Mistura Eutética de Anestésico Local), o cloridrato de levobupivacaína, o cloridrato de bupivacaína, o cloridrato de lidocaína (CL) ^{7,76}. Os três últimos AL's pertencem à classe dos amino-amida, sendo o CL um fármaco de grande utilização, servindo de comparação para determinação da potência de outros AL's ⁷.

Para o presente estudo, o SG e o CL foram escolhidos devido ao histórico frequente de utilização desses fármacos em estudos de liberação, além da contraindicação ao uso oral, no caso do SG ^{7,13} e da consolidação de seu uso como anestésico local, no caso do CL.

3.6.1 Sulfato de Gentamicina

O SG é um antibiótico e como tal tem a função de inibir a multiplicação de bactérias e outras infecções, buscando também a eliminação das mesmas ^{7,75,77,78}. A aplicação desse fármaco é usual como carga medicamentosa em cimentos ósseos ^{7,19}. Antibióticos são usados frequentemente em cimentos ósseos na fixação e revisão de próteses de joelhos, buscando evitar infecções ¹⁹.

O SG ($C_{60}H_{125}N_{15}O_{25}S$) ⁷⁹ é um medicamento pertencente à classe dos compostos conhecida como antibióticos aminoglicosídeos, que foi isolado primeiramente por Weinstein *et al.* em 1963, em consequência da fermentação de duas espécies provenientes do gênero *Micromonospora* (*Micromonospora purpurea* e *Micromonospora echinospora* ^{7,24,80-84}). Sua utilização é comum em conjunto com outros antibióticos para tratamento de infecções severas, com aplicações em tratamentos de endocardite, pneumonia em pacientes hospitalizados e como terapia complementar em casos de meningite por listeria ¹³. É efetivo também contra bactérias *Gram-negativas* (por exemplo, *Escherichia Coli*) e alguns *Gram-positivas* (por exemplo, *Staphylococcus aureus*) ⁸². A gentamicina não é metabolizada e sim basicamente descarregada

dentro do espaço extracelular, antes de ser excretada pelos rins através de filtração glomerular ^{7,81}.

O uso desse medicamento é limitado devido aos efeitos potencialmente adversos como ototoxicidade (nocivo à região coclear) e nefrotoxicidade (nocivo aos rins), resultado do uso em grandes quantidades e em tratamentos de áreas extensas ^{7,81}. Na Figura 8 é possível observar a fórmula estrutural do SG.

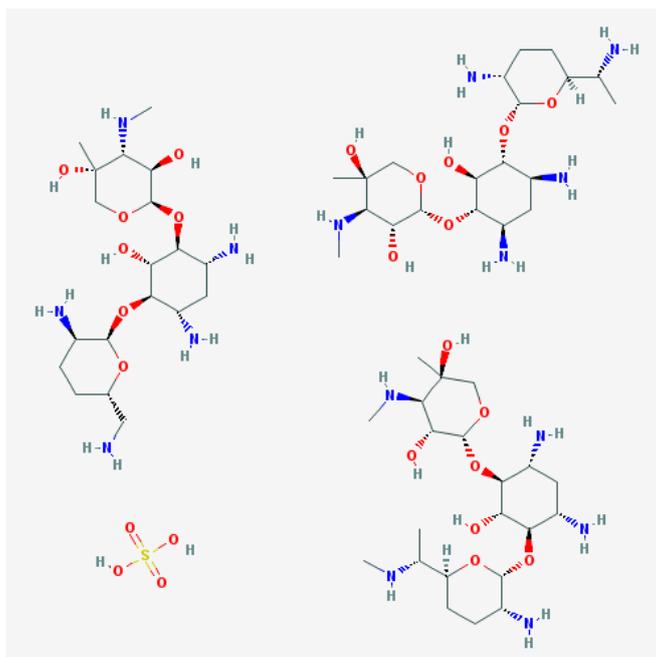


Figura 8 - Fórmula estrutural do sulfato de gentamicina.
Fonte: PubChem.

O SG é encontrado como pó branco de sal de sulfato perolado e higroscópico ⁷. Não é possível ser absorvida por via oral, sendo sua rota de administração por injeção intravenosa lenta ou injeção intramuscular, normalmente três vezes ao dia ^{7,13}. A dose única é indicada como medida profilática para cirurgias ou procedimentos invasivos, como colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (exame do sistema digestivo que inclui vesícula biliar, pâncreas e canais de drenagem desse sistema) e também para tratamento de gonorreia, sendo possível que a única dose seja menos tóxica e que apresente menor risco de efeitos adversos ⁸¹.

Os variados efeitos colaterais resultantes da aplicação de doses inadequadas em pacientes, impulsionam o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a administração de doses localmente, reduzindo assim as ocorrências de

superdoses no organismo dos pacientes. A dose local proporciona um maior controle dos riscos presentes na administração de medicamentos pelas vias convencionais ⁷.

No caso da incorporação de SG em CFC, ocorre um controle das dosagens de medicamentos em contato com o local, o que torna esse medicamento mais útil em tratamentos de enfermidades ligadas ao tecido ósseo ^{18,85}.

O controle da liberação desse antibiótico, pela matriz de fosfato de cálcio cerâmica, se mostra interessante, em comparação com as vias convencionais de administração de medicamentos, por proporcionar aplicação de doses apropriadas nos locais onde os métodos convencionais não conseguem disponibilizar dosagens suficientes, como ocorre em aplicações de fármacos para tratamento do osso avascular. Também existe a possibilidade de maior controle dos níveis séricos do SG (acima de 12 µg/mL requer atenção especial), reduzindo os riscos de complicações devido ao excesso de medicamentos na corrente sanguínea ⁷.

3.6.2 Cloridrato de Lidococaina

Os AL's são medicamentos utilizados com o objetivo de promover bloqueio temporário da condução nervosa, levando a perda das sensações e prevenção de movimentos na região onde o fármaco é absorvido, sem que isso provoque a perda da consciência pelo paciente ^{7,86,87}. Esse bloqueio se dá pela ação de canais iônicos (de sódio) na membrana celular neuronal, impedindo a neurotransmissão do potencial de ação ao longo dos neurônios, impossibilitando a transmissão de informação a partir do sistema nervoso central ^{7,75,87,88}.

A utilização desses anestésicos é bastante ampla, podendo ser empregada em tratamento de queimaduras, cortes pequenos, injeções durante tratamento dentário, procedimentos obstétricos e cirurgias de grande porte ⁸⁷.

O CL é o anestésico padrão que serve de comparação para os demais AL's, por possuir uma atuação mais versátil, com uma ação inicial rápida, que o torna opção mais frequentemente utilizado entre os fármacos para fins de analgesia

(inibição da dor). Além disso, o CL ($C_{14}H_{23}ClN_2O$)⁸⁹ possui duração e toxicidade moderadas e atividade tópica adequada, sendo também indicado para tratamento de arritmia cardíaca com administração por via intravenosa, em casos de urgência cardiológica ou em cuidados intensivos⁸⁶. A fórmula estrutural do cloridrato de lidocaína está representada na figura 9.

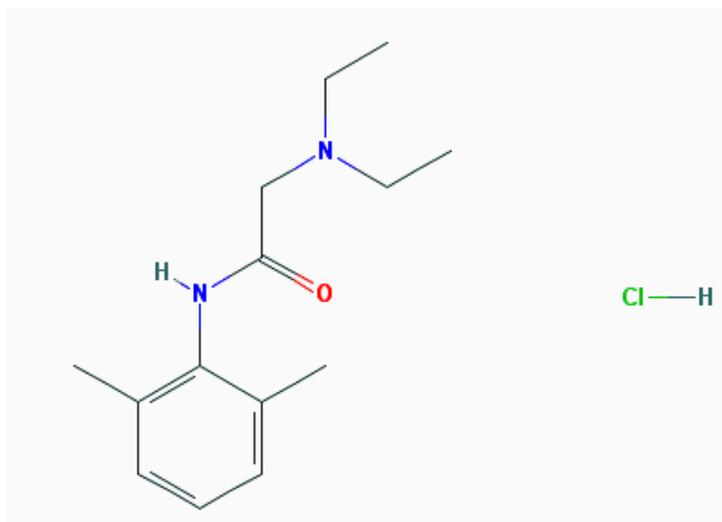


Figura 9 - Fórmula estrutural do cloridrato de lidocaína.
Fonte: PubChem.

O CL apresenta anéis aromáticos em sua cadeia, que conferem um caráter hidrofóbico a esse material, assim como ocorre em todos os anestésicos locais, ou seja, uma variação de hidrofobicidade está diretamente relacionada à alterações nesse anel. A hidrofobicidade também se altera com modificações no grupo amino, mais precisamente no nitrogênio pertencente a esse grupo⁸⁷. Os mesmos anéis aromáticos, juntamente com o comprimento da cadeia de hidrocarbonetos, geram uma interação entre a lipossolubilidade do AL e a potência. Como resultado desse comportamento ocorre um maior efeito do fármaco, devido à facilidade de penetração na membrana celular⁷. A quantidade de droga utilizada, durante a administração do fármaco, tem relação com esse fenômeno, porque uma maior potência resulta em uma menor quantidade de fármaco requerida numa determinada aplicação⁷. Buscando a utilização de fármacos em dosagens limitadas durante as variadas intervenções realizadas, sistemas de controle de liberação de fármacos podem ser empregados, para que os anestésicos se mantenham encapsulados até

chegarem a um determinado sítio e possam ser liberados em quantidades adequadas com o passar do tempo.

Liberação controlada desses fármacos tem como vantagem trabalhar propriedades físico-químicas, que podem vir a restringir o uso da droga em certos casos como, por exemplo, solubilidade do medicamento em meios aquosos. A possibilidade de contornar essas propriedades tem consequências sobre o efeito terapêutico, sobre a absorção e distribuição tecidual e provoca também redução da toxicidade local e sistêmica das drogas encapsuladas ⁹⁰.

Os materiais utilizados como encapsuladores são também chamados de carreadores, estando os lipossomas entre os mais interessantes materiais utilizados para esse fim ⁹⁰.

O cimento de fosfato de cálcio se mostra uma matriz interessante para utilização como carreador de cloridrato de lidocaína, possibilitando controle da quantidade de fármaco liberada durante um procedimento, reduzindo a chance de efeitos colaterais relacionados ao excesso de dosagens e ampliando a utilização do medicamento.

3.8 Métodos de Medições de Liberação de Fármaco

Na realização dos diversos estudos presentes em literatura sobre liberação controlada de fármacos, existe a necessidade de determinação da quantidade de fármaco, que se move de dentro para fora de uma matriz com o passar do tempo, definindo assim o perfil de liberação desse sistema.

Existem várias técnicas com utilização consolidada no estudo de liberação de fármacos. Entre as mais utilizadas para essa finalidade existe a Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível (UV-Vis) ^{9,15-19,69,91,92}, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (sigla em inglês HPLC) ^{20-22,74} e o ensaio de Imunofluorescência por Polarização (sigla em inglês FPIA) ^{23,24,72}.

3.8.1 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível (UV-Vis)

A técnica de UV-Vis é uma das técnicas mais antigas em espectroscopia molecular, que teve sua formulação conhecida como Lei de Bougher-Lambert-

Beer que foi apresentada em 1852. Graças a essa fórmula, foi possível desenvolver a técnica de medida de quantidade de radiação absorvida por um material em um determinado comprimento de onda (absorbância) ^{93,94}. A equação 8 mostra a representação de Lei de Lambert-Beer.

$$A = \epsilon cl \quad (8)$$

Onde A é a absorbância, ϵ é o coeficiente de absortividade molar do material, c é a concentração das espécies absorvidas e l é a largura da cubeta de vidro ou de acrílico, onde a solução é colocada.

A absorção de luz, em função do comprimento de onda, possibilita a obtenção de informações sobre a movimentação de elétrons em um material. A fração de luz que é transmitida é descrita na equação de Lambert-Beer ⁹⁵.

A solução, da qual se deseja determinar, a concentração, é colocada em uma cubeta com largura de 1 cm e, em seguida, essa cubeta é colocada dentro do espectrofotômetro para que a medição seja realizada. Uma segunda cubeta é colocada com a solução sem medicamento (branco), servindo de padrão para que o valor absorbância obtido seja apenas aquele relacionado ao material desejado.

Antes de realizar a medição das soluções desconhecidas é preciso efetuar a varredura de espectro, para que o pico de maior absorbância do medicamento estudado seja obtido e, com isso, é possível aumentar a sensibilidade da medição realizada. Em seguida, determina-se a curva de calibração (CC) do material estudado. Ela é obtida através da leitura de absorbância de concentrações conhecidas da solução, para que, após obtida a curva concentração definidas *versus* absorbância, os valores de absorbância das concentrações desconhecidas sejam inseridos na equação da reta resultante da CC, possibilitando a determinação das quantidades de fármaco liberadas em solução.

A grande vantagem do método UV-Vis está na velocidade de medição. Em questão de segundos os valores de absorbância são obtidos e podem ser armazenados em um banco de dados. Além disso, o equipamento não

necessita de um conhecimento avançado sobre a técnica por parte do operador.

Uma desvantagem dessa técnica é o intervalo em que a medida de absorvância perde a sensibilidade, podendo fornecer valores mascarados como resultado. Materiais que possuem coeficiente de absorvância baixo são difíceis de terem sua concentração definida pela técnica, do mesmo modo que materiais com absorvância, acima do intervalo de comprimento de onda limite do equipamento, não podem ter a concentração determinada por essa técnica.

Outra desvantagem é a possibilidade de interação entre o material do qual se deseja determinar a concentração e a solução na qual ele está disperso. Caso se forme um composto entre esses dois materiais e esse possuir espectro de absorvância próximo ou idêntico ao do material de estudo, o valor de absorvância obtido não será correto.

3.8.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é um método analítico baseado em propriedades físicas e utilizado há mais de 50 anos ⁹⁶. Essa técnica envolve diversos processos de separação de misturas com separação dos constituintes de uma amostra, processos esses que se dão pela migração da amostra através de uma fase estacionária com a ajuda de um fluido ⁹⁷. A utilização dessa técnica possibilita realização de separação de misturas, identificação e quantificação de seus componentes ⁹⁸. A separação se dá pela aplicação de pressões elevadas (chegando a 400 atm), obrigando a passagem do solvente por colunas fechadas que possuem partículas muito finas de um material sólido adsorvente. Essa pressão elevada força a separação do solvente em constituintes diferentes devido à afinidade relativa de cada componente do solvente.

As partículas utilizadas nesse equipamento, chamadas de fase estacionária, são de sílica ou polímeros, dentre outros materiais possíveis, e possuem tamanhos variando entre 2 e 50 μm . A fase móvel nesse método é líquida e

dissolve a amostra sem qualquer interação. Os solventes comumente utilizados são água, metanol e acetonitrila ²¹.

Uma das vantagens da utilização dessa técnica é a quantidade de solução necessária para realização do ensaio (200 µL), que é muito abaixo da quantidade necessária para a realização do ensaio por UV-Vis (aprox. 3 mL). Além disso, é uma técnica simples, que possibilita manuseio de pequenas quantidades de amostra (10^{-9} a 10^{-15} g) ⁹⁹.

Sua desvantagem está na preparação das soluções, que precisam estar bem diluídas e posterior descarte das mesmas.

3.8.3 Ensaio de Imunofluorescência por Polarização (FPIA)

A técnica de Imunofluorescência por Polarização (FPIA) se baseia no aumento da fluorescência por polarização das substâncias estranhas ao organismo (antígenos) marcadas por fluorescência, quando ligados por anticorpos específicos ¹⁰⁰. Trata-se de uma concorrência entre o antígeno não marcado e sua derivação marcada por fluorescência (marcador). O antígeno é medido pela redução do sinal de fluorescência por polarização que, por sua vez é determinado pela redução das moléculas do marcador, capazes de se ligar ao anticorpo em solução ¹⁰¹.

Esse método tem como vantagens sua precisão e sensibilidade de determinação de substâncias. Já como desvantagem tem-se a limitação do uso para moléculas pequenas como medicamentos e hormônios pequenos ^{101,102}.

3.9 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A técnica de EIS é uma técnica relativamente nova de caracterização elétrica, bastante disseminada e que possibilita o acompanhamento de fenômenos eletroquímicos diversos em materiais sólidos, líquidos e dispositivos eletrônicos ¹⁰³⁻¹⁰⁵. Nos estudos de células fotovoltaicas ²⁷, células combustíveis ¹⁰⁶ e corrosão ¹⁰⁷ existem muitos experimentos realizados com o uso dessa técnica como meio de caracterização de materiais, verificando o comportamento

elétrico da amostra sem causar danos à mesma e com realização de medições rápidas ^{7,108}.

A impedância se refere à resposta de um material à aplicação de um estímulo elétrico (sendo ele de corrente ou tensão). É assumida uma invariância virtual em relação ao tempo das elétricas de um sistema material/eletrodo ¹⁰³. No caso da aplicação de tensão em corrente contínua, a resposta esperada é de acordo com a primeira Lei de Ohm como mostrado na equação 9.

$$R = V/I \quad (9)$$

Onde R é a resistência ôhmica, V é a tensão e I é a corrente. Nesse caso, a tensão e a corrente se encontram em fase uma em relação à outra. Para essa situação, a variação dos valores de frequência não tem efeito sobre os valores de resistência, ou seja, a resistência é constante durante a variação da frequência como mostra a figura 10.

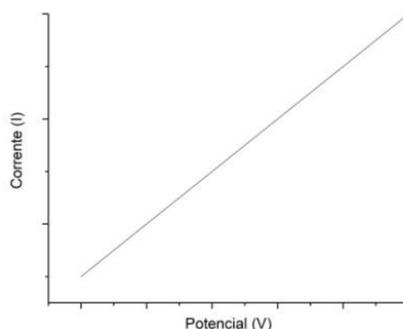


Figura 10 - Definição de resistência Ôhmica. Adaptado de SANTOS, 2007.¹⁰⁸.

Sendo assim, corrente e tensão estão em fase, o que significa que eles não possuem acréscimo nos valores de suas senóides, quando comparadas entre si. A situação em que a resistência se apresenta como resistência ligada somente a 1º Lei de Ohm (equação 8) ocorre quando a corrente contínua é aplicada ¹⁰⁸.

No caso de aplicação de estímulo elétrico em que a tensão aplicada é para uma corrente do tipo alternada, o que se tem é a presença de mais de um tipo de resistência. Além da resistência ôhmica, proveniente da corrente contínua, também estão presentes as resistências de capacitores e indutores, que recebem o nome de reatância. No caso da resistência ôhmica (parte real),

energia gerada é dissipada na forma de calor, enquanto que no caso da reatância (parte imaginária) a energia é armazenada em campos magnéticos ou elétricos com perda de calor. Sendo por fim, a impedância definida como o módulo da soma das partes real e imaginária ^{104,108}. A equação 10 exibe a representação do módulo de impedância, mostrando a parte real (Z') e a parte imaginária (Z'') que a compõe.

$$|z| = [(Z')^2 + (Z'')^2]^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

No elemento indutivo a corrente está atrasada e no elemento capacitivo a corrente está adiantada em relação ao potencial aplicado em função da frequência ¹⁰⁸.

Durante as realizações das medições de impedância, um ponto de fundamental importância é a influência da perturbação do sistema quando da aplicação de um estímulo elétrico. Pode ocorrer maiores interferências no sistema quando se aplica um potencial elevado e essa perturbação em excesso reflete nos valores finais de impedância. A adição de gás inerte durante as medições, a agitação magnética (AM) e a realização de medições sem a adição de fármaco para posterior subtração dos resultados das medidas com fármaco, são alguns dos meios para reduzir a influência desse tipo de dispersão, tornando assim a medida mais representativa dos fenômenos eletroquímicos, que ocorrem durante a medição ¹⁰⁹.

3.9.1 EIS para Liberação de Fármacos em Matriz de CFC

Um dos trabalhos encontrados sugerindo a utilização de EIS para determinação de porcentagem de liberação foi publicado por COLPO *et al.*(2015) ⁶⁸. Nele são feitas medições de liberação de SG de matriz cerâmica de CFC do tipo α -TCP em PBS pH 7,0. Os estudos desenvolvidos por esses pesquisadores foram utilizados como base para desenvolvimento do trabalho em questão. Nos trabalhos desses autores foi observada a variação dos valores de resistência obtidos no diagrama de Nyquist, à medida que a

quantidade de fármaco em PBS se alterava. O circuito equivalente (CE) obtido foi do tipo R(RQ)(RQ).

PASQUAL *et al.*¹¹⁰ apresentaram no segundo trabalho encontrado em literature, que trata sobre EIS em liberação para CL, resultados que mostram a correlação entre os CE's obtidos através dos resultados de EIS e a presença do fármaco na solução PBS pH 7,4. Nos resultados desses autores o CE encontrado foi de R(RQ)(RQ)(RQ), sugerindo a existência de uma interface de íons próxima a interface eletrodo/eletrólito, diferentemente das análises de Colpo *et al.*⁶⁸.

Na utilização de EIS, para medidas de liberação de fármaco, uma das grandes desvantagens é a necessidade de grande conhecimento por parte do pesquisador sobre a teoria que envolve a técnica, sem esse conhecimento é impossível realizar o estudo. Também é preciso grande conhecimento dos fenômenos físico-químicos que envolvem o processo de liberação de fármacos, tais como os processos de difusão, de transferência de massa, processo de formação de dupla camada elétrica, de oxidação e de polarização, dentre outros.

3.9.2 Dupla Camada Elétrica

Quando se tem um sistema com eletrodos em contato com uma solução, numa célula eletroquímica, existem diferenças nas forças que atuam sobre as moléculas, quando estas estão cercadas por espécies semelhantes ou quando estão em contato com outros tipos de espécies. Na região de interface eletrodo/eletrólito existe de um lado a solução com um comportamento e concentração de íons específica, e do outro o eletrodo que apresenta um carregamento elétrico diferente. Esses fatos provocam uma diferença de potencial na região de interface e essa diferença é chamada de dupla camada elétrica. Trata-se de um processo anisotrópico resultante da interação entre superfície do eletrodo de trabalho e eletrólito. O processo envolve difusão, tensão de superfície, densidade de cargas e adsorção de íons na superfície do eletrodo.

Existem vários modelos que tentam explicar os resultados experimentais relacionados à dupla camada elétrica. O mais antigo é o modelo de Helmholtz datado de 1879. Também existe o modelo de Gouy-Chapman e as propostas de Stern, Grahame e Bockris ¹¹¹. Esse fenômeno se diferencia do fenômeno de polarização do eletrodo, pelo fato de ocorrer exatamente na interface. A polarização do eletrodo acontece próximo à essa região, porém sem que ocorra adsorção sobre a superfície desse eletrodo, é um fenômeno que ocorre próximo à região de dupla camada.

3.9.2.1 Modelo de Von Helmholtz

Esse modelo foi o primeiro a sugerir a estrutura física da dupla camada elétrica. Ele é conhecido como modelo de um capacitor de placas paralelas, como pode ser observado na figura 11.

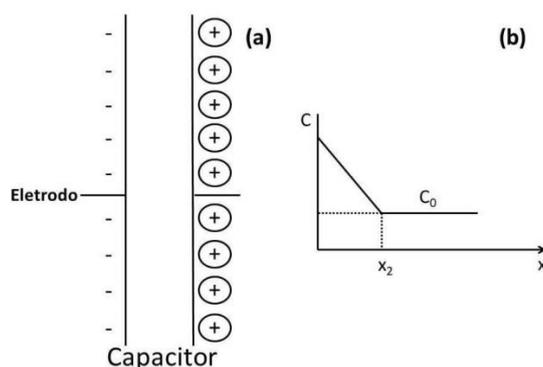


Figura 11 - Modelo de Helmholtz (a) para um eletrodo de superfície plana e (b) a variação da concentração na interface. Adaptado de BRETT, 1993 ¹¹².

A placa formada por adsorção na superfície do eletrodo (Fig. 11a) não tem existência física concreta, trata-se do acúmulo, de forma alinhada, de íons na superfície do metal. A concentração (C) nessa região reduz, à medida que se afasta da interface em direção ao centro da solução (distância x), como pode ser visto na Figura 11b. Essa redução ocorre até o equilíbrio na distância infinita em direção ao seio da solução.

Esse modelo tem como uma de suas limitações os equacionamentos que sugerem que a capacidade da dupla camada é independente do potencial do eletrodo, o que na prática não procede. Mesmo com essas restrições, esse

modelo é importante, por proporcionar uma análise qualitativa do fenômeno de formação da dupla camada elétrica ^{111,112}.

3.9.2.2 Modelo de Gouy-Chapman

Gouy e Chapman foram dois pesquisadores que desenvolveram separadamente o modelo de camada difusa, também conhecido como modelo de Gouy-Chapman, com o objetivo de eliminar as limitações do modelo proposto por Helmholtz. Esse modelo considera a variação da concentração de íons também como agente importante na formação da dupla camada elétrica, contribuindo para a formação de uma camada de espessura variável e com fronteiras indefinidas, diferente do que sugere o modelo de Helmholtz. Além disso, nesse modelo as espécies estão em movimentação constante, formando assim a camada volumétrica difusa que dá nome ao modelo. O perfil de concentração nesse modelo é semelhante ao sugerido para o modelo anterior, com aumento da concentração de espécies na interface e redução, à medida que se afasta dessa superfície e se aproxima do interior da solução, chegando a uma constante de concentração depois de percorrida uma distância x , que mede alguns angstroms ^{111,112}. A Figura 12 representa o modelo proposto por Gouy e Chalpman.

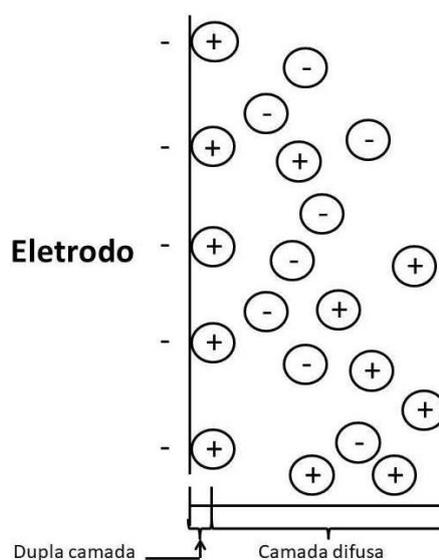


Figura 12 - Modelo de Gouy-Chapman. Adaptado de BRETT, 1993 e TICIANELLI 2005 ^{111,112}.

A limitação desse modelo está em seu equacionamento, que é válido somente em uma determinada região de potencial e somente para soluções diluídas, fornecendo resultados com menor precisão nessa análise, quando comparado com o modelo de Helmholtz ¹¹¹.

3.9.2.3 Propostas de Stern e Grahame

O físico Otto Stern em 1924 sugeriu a consideração de que a distribuição difusa dos íons, da camada que eles formam, começasse na superfície do eletrodo e não após a dupla camada elétrica como resposta para as limitações da teoria proposta por Gouy e Chapman. Na prática, a camada de dipolos do solvente e as camadas de solvatação impedem que essa camada comece desde a superfície do eletrodo. Os íons só se aproximam da superfície até certa distância como pode ser observado na Figura 13 ^{103,111}.

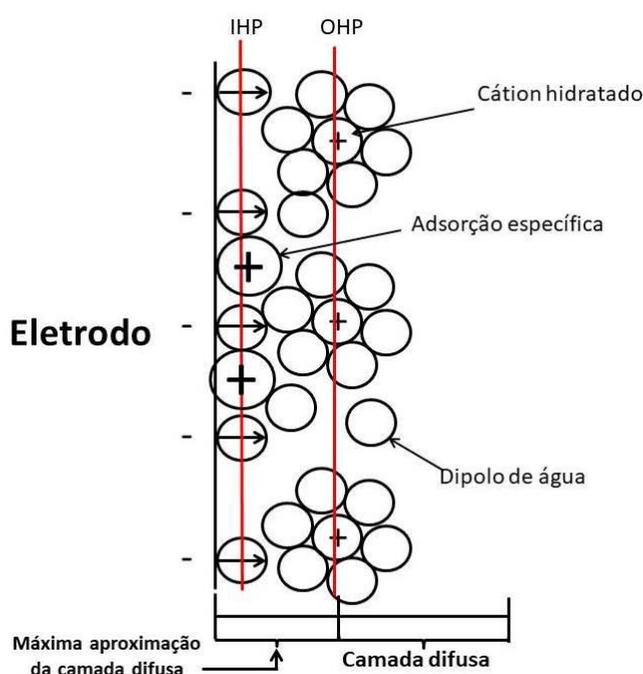


Figura 13 – Proposta de Stern. Adaptado de TICIANELLI, 2005 ¹¹¹.

Na imagem o termo IHP se refere à camada interna de Helmholtz e o termo OHP se refere à camada externa de Helmholtz, que são tidas como limites das regiões próximas à superfície do eletrodo.

Complementando a proposta de Stern, Grahame observou, através de experimentos, a variação da concentração do eletrólito influenciando na

capacidade da camada difusa. Após realizar os experimentos, Grahame concluiu que a capacidade da camada difusa se eleva com a elevação da concentração do eletrólito.

Ainda, de acordo com a teoria de Grahame, a adsorção de espécies pode ocorrer de duas formas. A primeira através de interação fraca entre eletrodo e íons, que leva à aproximação desses íons numa distância igual ao diâmetro da molécula de água somado com o raio dos íons das moléculas de hidratação presas á ele (máxima aproximação da camada difusa) ¹¹¹.

A outra forma de interação proposta na teoria de Grahame sugere que alguns ânions que possuem fraca capacidade de hidratação, se aproximam e adsorvem na superfície do eletrodo, por possuírem forte interação com o mesmo. Essa forte interação leva ao deslocamento das moléculas de água, fazendo com que esses íons fiquem em contato direto com o eletrodo, promovendo a chamada adsorção específica.

3.9.3 Resistência à Polarização

A aplicação de uma diferença de potencial em um eletrodo, com a utilização de uma fonte externa, leva ao carregamento do eletrodo. Como resultado desse carregamento, ocorre o direcionamento dos íons, que se encontravam dispersos desordenadamente entre os eletrodos da célula eletroquímica. Os íons, antes dispersos, se direcionam para a interface, assim como ocorre no fenômeno de dupla camada elétrica. Porém, como já existem íons de carga oposta à carga do eletrodo acumulados na interface, formando a dupla camada elétrica, os íons seguintes que se aproximam são repelidos, por serem de mesmo sinal dos íons já adsorvidos na superfície ¹¹¹.

Juntamente com o efeito de repulsão na interface eletrodo/eletrólito, ocorre a formação de dipolos induzidos, que inibem ainda mais a movimentação de íons na direção da superfície do eletrodo. Esses, entre outros fenômenos, dificultam o acúmulo de íons próximo à superfície do eletrodo e, conseqüentemente, reduzem o efeito de polarização do mesmo, aumentando a resistência à polarização ¹¹¹.

3.11 Voltametria Cíclica

Voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica que possibilita obtenção de informações qualitativas e quantitativas relacionadas a uma espécie química, através do registro de curvas tensão versus corrente. O que se tem basicamente é a aplicação de um potencial seguida de medições de correntes, relacionadas ao intervalo de potencial desejado, com repetição de medições formando ciclos de oxidação e redução do sistema estudado. É uma técnica amplamente utilizada no campo da eletroquímica ¹¹³⁻¹¹⁵. A VC possibilita uma rápida observação do comportamento redox sobre um intervalo de potencial aplicado em um eletrodo, que se encontra imerso em uma solução, com medição da corrente resultante dessa ciclagem de potencial ⁹⁴. O eletrodo que sofre variação de potencial, dentro de um intervalo pré-definido, é chamado de eletrodo de trabalho, seu potencial é controlado pelo eletrodo de referência. O controle do potencial, que é aplicado através desses dois eletrodos, pode ser considerado um sinal de perturbação ¹⁰⁹. A Figura 14 mostra o sinal de perturbação que é tido como uma varredura linear de potencial.

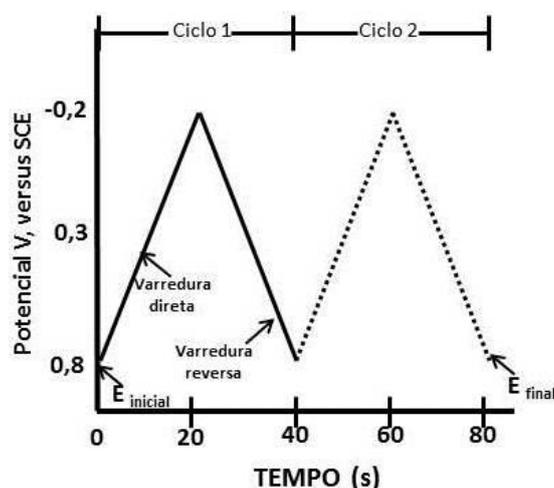


Figura 14 - Sinal típico de perturbação para voltametria cíclica – um formato de onda potencial triangular com potenciais de comutação de 0,8 até -0,2V *versus* eletrodo de calomelano saturado (SCE). Adaptado de KISSINGER, 1993 ¹⁰⁹.

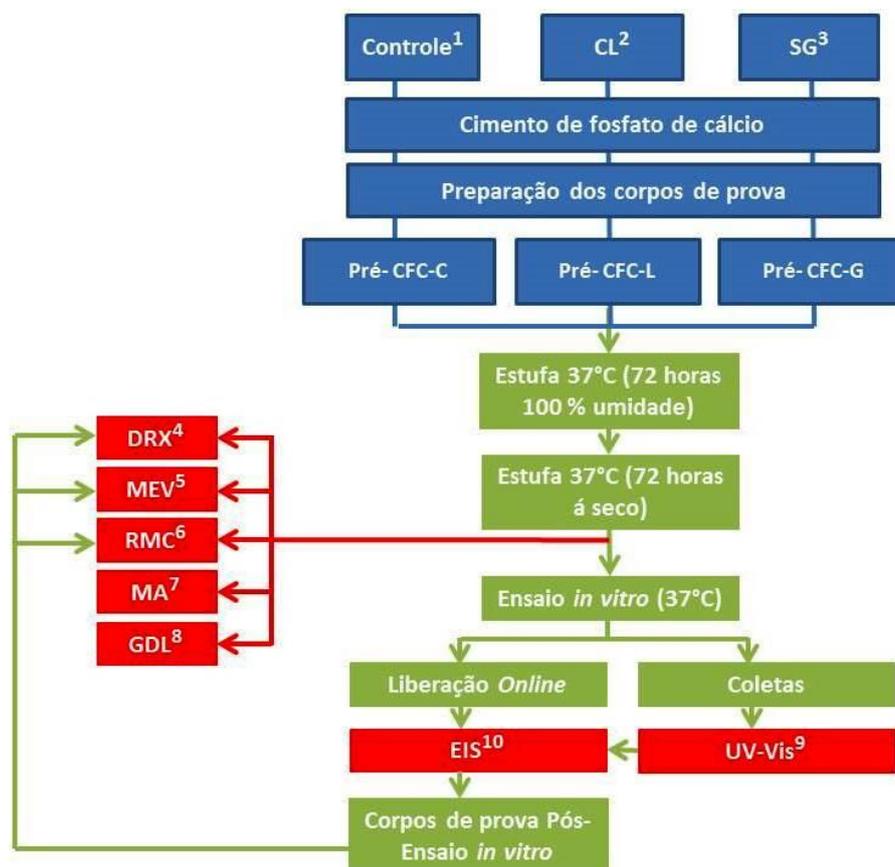
O potencial de perturbação triangular varia o potencial do eletrodo entre dois valores, que são chamados também de potencial de comutação.

Durante o processo voltamétrico pode ocorrer difusão das espécies eletroativas, que são transportadas do seio da solução para a superfície do

eletrodo. Caso ocorra agitação da solução, pode ocorrer transporte de espécie por convecção e ainda pode ocorrer o transporte por migração, que é governado pela presença de campo elétrico, levando á movimentação das espécies carregadas ¹¹⁶.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia usada neste trabalho envolveu inicialmente a preparação dos corpos de prova para liberação dos fármacos, neste caso, o cimento de fosfato de cálcio. Seguido da montagem do porta amostras para medidas elétricas, seleção do fármaco, liberação do fármaco e caracterização. A metodologia partiu de parâmetros estabelecidos por Colpo ⁷, que iniciou os estudos de liberação de fármacos em CFC por EIS no Laboratório de Biomateriais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LABIOMAT). A Figura 15 apresenta um fluxograma da metodologia utilizada para o desenvolvimento do trabalho para obtenção e caracterização das amostras CFC-C (controle), CFC-L (com cloridrato de lidocaína) e CFC-G (com sulfato de gentamicina).



1) Controle = Cimento sem fármaco; 2) CL = Cloridrato de lidocaína; 3) SG = Sulfato de gentamicina; 4) DRX = Difração de Raios X; 5) MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura; 6) RMC = Resistência Mecânica à Compressão; 7) MA = Método de Arquimedes; 8) GDL = Granulometria Difração à Laser; 9) UV-Vis = Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível; 10) EIS = Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

Figura 15 - Desenho do estudo de liberação de fármacos em matriz de CFC.

4.1 Preparação das Amostras

As amostras de CFC-C foram obtidas por via térmica através de calcinação á 550° C de fosfato de dicálcico dihidratado (DCPD) por 5 horas, seguida da mistura do gama pirofosfato (γ -CPP), obtido após a queima ao carbonato de cálcio (CaCO_3) na proporção de 0,3935 (CaCO_3/γ -CPP) por 20 minutos. Por fim, essa mistura foi sinterizada a 1500° C por 3 horas, resultando no fosfato tricálcico na fase alfa. Os tratamentos térmicos aconteceram em um forno mufla (SANCHIS) para a queima do DCPD e em um forno elétrico (CARBOLITE) para a queima da mistura γ -CPP + CaCO_3 . Após resfriamento, o material obtido foi macerado em almofariz de porcelana e peneirado em peneira de malha ABNT 325#. A partir dessa etapa, o material passa a ser chamado de cimento de α -fosfato tricálcico (α -TCP). A obtenção do α -TCP é representada na equação 11.



Foram preparados três grupos de amostras, um sem a adição de fármaco fornecido pela empresa Cristália, o segundo com adição de SG e o terceiro com adição de CL, classificados em grupos controle e grupos testados em liberação.

Os medicamentos foram misturados ao cimento mecanicamente com a ajuda de uma espátula numa proporção de 1% para CL e 2% para SG. Essas concentrações foram escolhidas com o intuito de utilizar uma baixa quantidade de fármacos garantindo, no entanto, uma porcentagem mínima para que a presença desses medicamentos seja perceptível. Essa necessidade está ligada, principalmente, à sensibilidade mais limitada do UV-Vis em comparação com a EIS. Durante a preparação dos corpos de prova, a solução de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 2,5% m/v foi adicionada para promover a aceleração da reação de pega. A relação L/S, utilizada na preparação do cimento, com e sem fármaco foi de 0,3 mL/g^{6,25}. Logo após essa etapa, a mistura de cimento e solução de Na_2HPO_4 2,5% m/v passou por vibração, a fim de facilitar a conformação das amostras.

As amostras foram colocadas em moldes de polipropileno e prensadas contra os machos dos moldes, em uma prensa uniaxial com carga de 1 ton por 30 segundos, resultando numa tensão de compressão de, aproximadamente, 115,61 MPa. Após a prensagem, as amostras foram retiradas dos moldes e colocadas em estufa à 37°C a 100% de umidade durante 72 h e depois por mais 72 h a 37°C em estufa à seco. As amostras obtidas possuíam dimensões de 12 mm ($\pm 0,1$ mm) de altura e 6 mm de diâmetro ($\pm 0,1$ mm) ^{7,19,25,68}.

Após preparação, as amostras passaram por teste de liberação *in vitro*, sendo posteriormente analisadas para comparação com caracterizações feitas nos CFC não submetidos aos testes de liberação. No total foram caracterizados 2 grupos, sendo um deles composto de 3 tipos de cimentos submetidos ao teste de liberação *in vitro* e o outro composto de 3, que não passaram pelo teste de liberação, de acordo com o esquema que segue na figura 16.

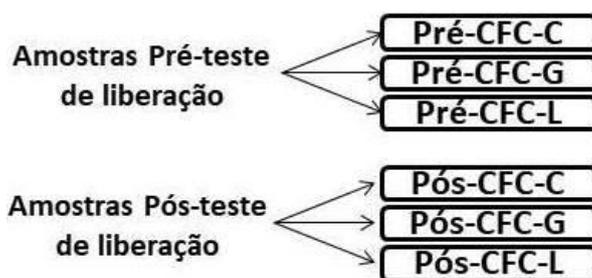


Figura 16 - Nomenclatura das amostras estudadas.

4.2 Preparação da Solução Tampão Fosfato

Uma solução tampão foi utilizada com o objetivo de manter as condições do teste de liberação *in vitro* mais próximo possível de um ambiente corpóreo. A solução tampão fosfato (Phosphate Buffer Solution – PBS) com pH 7,4 foi obtida de acordo com o protocolo mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Solução tampão fosfato pH 7,4¹¹⁷.

Componentes	Quantidade
Na ₂ HPO ₄	2,0209g
NaH ₂ PO ₄	0,3394g
HCl	0,017 mL
NaOH	Correção de pH
Água destilada	100 mL

Depois de adicionados e misturados os compostos, NaOH foi adicionado para correção do pH caso ele não esteja em 7,4. Essa correção pode ser necessária dependendo do pH da água destilada utilizada na preparação.

4.3 Liberação de Fármacos

O teste de liberação *in-vitro* foi realizado em tubos de ensaio de 10 mL que tiveram todo o volume preenchido com PBS. Os fármacos utilizados neste trabalho foram escolhidos devido ao seu uso comum em testes de liberação controlada, impulsionado pela alta aplicabilidade em tratamentos, além da impossibilidade de utilização por via oral, obrigando um uso intravenoso e intramuscular, no caso do SG.

Todas as amostras foram colocadas em tubos separadamente e mantidas sob agitação e temperatura de 37° C em PBS pH 7,4 ¹¹⁸ durante 15 dias. Para garantir que toda a área superficial da amostra estivesse em contato com a solução, uma tela de nylon foi colocada em volta da mesma, de modo a proporcionar a sustentação da amostra, evitando que ela ficasse depositada no fundo do tubo de ensaio, o que reduziria a área de exposição ao líquido durante o teste.

O acompanhamento do processo de liberação foi realizado primeiramente de forma contínua, ou seja, com medições de impedância *in situ* continuamente durante a difusão do fármaco do interior da matriz de CFC para o seio da solução PBS. Já no segundo estudo, passado cada intervalo de tempo pré-terminado, foram retiradas, armazenadas e congeladas e novas quantidades de PBS foram adicionadas para substituir a quantidade retirada ^{7,19}. Os tubos de ensaio foram completados com nova PBS e retornados ao teste de liberação.

No segundo caso, depois de terminado o teste de liberação, as soluções foram analisadas por Espectroscopia de Absorção por Ultravioleta-Visível no Espectrofotômetro de UV-Vis Varian Cary 100. Os valores de comprimento de onda, com maior absorbância dos dois fármacos encontrados durante a varredura de espectro, foram de 249 nm para o SG e de 263 nm para o CL. Através dessas informações foi possível verificar a absorbância de cada amostra e correlacioná-la com a concentração de fármaco presente na solução.

A análise por UV-Vis foi utilizada para validar o estudo dos fenômenos de liberação utilizando EIS.

4.4 Célula Eletroquímica

Para a realização das medidas de EIS foi necessário o desenvolvimento de uma célula eletroquímica específica, para realização do ensaio durante o teste de liberação de fármacos com capacidade de armazenamento de 10 mL de solução. A célula de vidro utilizada. Com 14 mm de diâmetro e 97 mm de altura, possui uma tampa de cortiça, onde estão fixadas a chapa de platina com as dimensões 8 mm x 34 mm e espessura de 0,25 mm, definida como contra eletrodo, e um fio do mesmo material com diâmetro de 0,25 mm e comprimento de 40 mm, definido como eletrodo de trabalho (sigla em inglês WE). Os eletrodos foram feitos de platina devido à sua maior estabilidade, o que dificulta a corrosão desses materiais quando da aplicação de um potencial elevado ¹¹⁹. A Figura 17 mostra o esquema da célula eletroquímica montada.

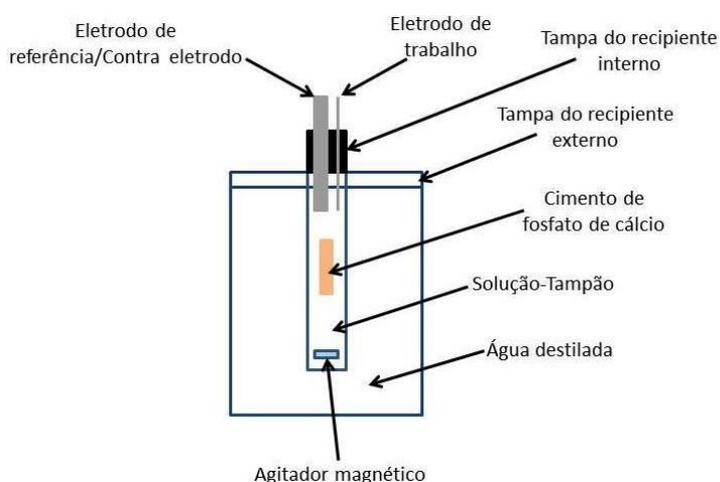


Figura 17 - Célula eletroquímica para liberação de fármacos *in situ continuamente*.

Buscando realizar as medições de EIS com o maior controle possível sobre as variações dos parâmetros, foram realizados vários testes para padronização do método de determinação da concentração de fármacos, liberada de uma matriz de CFC para PBS. A tabela 4 mostra os diferentes parâmetros que foram analisados nas várias medições de impedância realizadas.

Tabela 4 - Parâmetros variados durante a calibração do método.

	Parâmetros
1	Diferentes valores de amplitude de potencial AC
2	PBS para diferentes valores de BIAS
3	Com e sem injeção de nitrogênio
4	Em ambientes com e sem AM
5	CFC-C em PBS

Assim, foi possível determinar um procedimento a ser seguido durante as medições de liberação de fármaco *in situ* continuamente e demais medições de soluções com concentrações desconhecidas de medicamentos, buscando correlação entre resistência e presença de fármacos em meio aquoso.

4.5 Caracterizações do Pó de CFC e dos Corpos de Prova com e sem Fármacos

4.5.1 Difração de Raios X (DRX)

A difração de Raios X foi realizada com o intuito de verificar as fases presentes, observando a influência dos fármacos e do teste de liberação na obtenção dessas fases. As análises foram realizadas no difratômetro *Phillips X'pert MPD*. A corrente utilizada foi de 40 mA com tensão de 40 kV, num intervalo de escaneamento de 20° até 60° e um aumento de 0,05°.

4.5.2 Granulometria por Difração a Laser

A técnica de granulometria por difração a laser foi utilizada para determinação do tamanho de partícula do pó do cimento, após peneiramento em peneira malha ABNT 325#. O equipamento utilizado para realização das medições foi o granulômetro CILAS®, modelo 1180, que trabalha numa faixa de detecção de 0,04 a 2500 µm. Nele foi possível obter, além do tamanho das partículas, a distribuição granulométrica das mesmas. Optou-se pela utilização de álcool isopropílico como meio líquido, buscando evitar a reação de hidratação nas partículas do cimento decorrente do contato com a água.

4.5.3 Método de Arquimedes

Através do Princípio de Arquimedes ¹²⁰ foi possível determinar a porosidade total, a densidade aparente, a porosidade aparente e a absorção de líquidos dos corpos de prova com e sem fármaco. Para tal foi preciso realizar a pesagem das amostras para obtenção do peso seco, peso úmido e peso imerso. As amostras foram secas em estufa antes da determinação do peso seco e em seguida, colocadas em querosene por 24 horas à 37° C (± 1°C) para posterior determinação do peso úmido, com a ajuda de um cesto metálica também submersa em querosene, no qual a amostra foi depositada como sugerido na norma ASTM C20-00. A relação volumétrica líquido/sólido utilizada foi de 50 ⁶.

A utilização de querosene, em substituição da água comumente usada se deu devido á possibilidade de reação entre água e cimento de fosfato de cálcio. O teste de porosidade foi realizado nas amostras antes do teste de liberação.

A determinação da Densidade Aparente, que é tida como a relação entre a massa da amostra e a massa de um volume de líquido total dessa massa, é dada pela equação 12.

$$DA = \left(\frac{P_s}{P_u - P_i} \right) \cdot \rho_l \quad (12)$$

Onde DA é a densidade aparente (g/cm³), P_s é o peso seco (g), P_u é o peso úmido (g) e P_i é o peso imerso (g) e ρ_l é a densidade do meio aquoso que, no caso do presente estudo, é a densidade do querosene ($\rho_l = 0,82 \text{ g/cm}^3$).

Utilizando o método geométrico, com o auxílio de balança e paquímetro, foi possível realizar a determinação da porosidade total das amostras de acordo com a equação 13.

$$P = 1 - \left(\frac{DA}{DR} \right) \cdot 100 \quad (13)$$

Onde P é a porosidade total, DA é a densidade aparente supracitada e DR é a densidade real do CFC (2,86 g/cm³) ⁵⁰.

A porosidade aparente (PA), dada pela porcentagem de poros abertos em uma amostra, é calculada de acordo com a equação 14.

$$PA = \left(\frac{P_u - P_s}{P_u - P_i} \right) \cdot 100 \quad (14)$$

Onde PA é a porosidade aparente, P_u é o peso úmido, P_s é o peso seco e P_i é o peso imerso.

A última equação (equação 15) utilizada, foi aquela relacionada ao cálculo da absorção de líquido (AbL) dada em porcentagem. Ela determina a quantidade de líquido absorvido por uma amostra, quando da imersão em um líquido, ou seja, a massa de líquido que a amostra absorve.

$$AbL = \left(\frac{P_u - P_s}{P_s} \right) \cdot 100 \quad (15)$$

Nessa equação AbL é a absorção de líquido, P_u é o peso úmido e P_s é o peso seco.

4.5.4 Resistência Mecânica à Compressão Axial

A resistência à compressão dos corpos de prova, com e sem fármaco, com dimensões de 6 mm \pm 0,1 mm de diâmetro e 12 mm \pm 0,1 mm de altura, foi realizada em cinco amostras de cada tipo (CFC-C Pré, CFC-G Pré e CFC-L Pré, CFC-C Pós, CFC-G Pós e CFC-L Pós) em máquina universal de ensaios da marca Instron[®] de modelo 3369. A velocidade de compressão aplicada nas amostras foi de 1,0 mm/min numa célula de carga de 2 kN. A resistência à compressão é obtida pela tensão de ruptura de um corpo de prova, que é dependente da força que atua na área transversal, de acordo com a equação 16.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (16)$$

Onde σ é a tensão de ruptura, F é a força necessária para provocar a fratura e A é a área transversal do corpo de prova ensaiado. Os corpos de prova não

foram submersos em solução para evitar liberação de fármacos decorrente do contato com líquido.

4.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada com o objetivo de verificar a influência da presença dos fármacos e do teste de liberação na microestrutura do cimento, buscando relação entre a presença dos medicamentos e possíveis alterações na morfologia do material. As imagens foram obtidas das superfícies de fratura do cimento, após recobrimento com uma camada de ouro. Foi utilizada tensão de aceleração de 15 kV, com magnificação de 4500X. O equipamento utilizado para essa análise foi o microscópio modelo JSM 6060 da marca JEOL.

4.6 Análise da Liberação de Fármacos durante Teste *in Vitro*

As soluções nas quais as amostras de CFC, com e sem fármacos, foram imersas durante o teste de liberação *in vitro* e analisadas com a ajuda de duas técnicas, o intuito foi de verificar os fenômenos relacionados ao teste e a quantidade de fármaco que foi liberado nessa solução (PBS) com o passar do tempo. Essa análise buscou determinar o perfil de liberação dos medicamentos em PBS e sua correlação com a variação das propriedades elétricas, com a variação da concentração de fármaco disperso nesse meio.

As técnicas utilizadas foram a UV-Vis e a EIS. O UV-Vis foi empregado nas coletas feitas durante intervalos de tempo pré-estabelecidos. Já a EIS foi realizada no momento do teste, podendo assim promover medições de impedância *in situ*, que neste estudo foram chamadas de medições *in situ* continuamente.

A determinação da concentração de fármacos por UV-Vis ocorreu em triplicatas das amostras retiradas nos intervalos estabelecidos. Os mesmos intervalos de tempo foram utilizados nas duas técnicas até os dois primeiros dias, após isso, só foram realizadas análises de UV-Vis. A solução utilizada, como controle

para realizar as devidas calibrações durante as análises, se manteve em contato com CFC-C, de acordo com o tempo de liberação para cada grupo de amostras, ou seja, a solução controle das amostras de 30 minutos se manteve em contato com CFC-C durante 30 minutos e, assim, também foi feito para os demais tempos.

4.6.1 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível

O equipamento de UV-Vis foi utilizado no trabalho em questão para determinação da quantidade de fármaco liberado em PBS com o passar do tempo. As coletas das amostras de 10 mL cada foram feitas a 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 192h, 288h e 360h foram armazenadas em congelador para posterior descongelamento e medição das quantidades de fármaco liberado em solução. As medições horárias, nas primeiras 8 horas, se fazem necessárias devido ao fenômeno de explosão de liberação comum em muitos estudos de liberação de fármaco ^{3,9,14}. Soluções padrões com concentrações de fármacos conhecidas foram preparadas e analisadas por UV-Vis, para determinação da curva de calibração. Essa curva foi utilizada para posterior obtenção da equação da reta, utilizada na determinação da quantidade de fármaco liberado nas soluções com concentrações desconhecidas.

Nessa reta, os valores de concentração são representados no eixo "X" e os valores de absorbância no eixo "Y". Uma vez obtidos os valores de absorbância das soluções desconhecidas, utiliza-se essa equação para obtenção dos valores de concentração de fármacos em cada amostra, medida para cada tempo. Ao final é feita uma soma dos valores para determinação do perfil de fármaco liberado em solução com o passar do tempo, em relação à quantidade total de fármaco presente na amostra.

Após obter os valores de absorbância pela análise de UV-Vis, esses foram adicionados na equação 8 juntamente com as demais variáveis, possibilitando a obtenção da quantidade de fármaco liberado após cada intervalo de tempo e, conseqüentemente, o perfil de liberação.

4.6.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica foi empregada nesse trabalho como ferramenta para determinação da correlação entre quantidade de fármaco liberado em PBS e variação das propriedades elétricas desse eletrólito, à medida que o teste de liberação transcorreu para as medições de liberação *in situ* continuamente.

As medições *in situ* continuamente foram realizadas durante os tempos de 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 24h, 48h. Antes das medições, períodos de aplicação de potencial longos (15 minutos) foram utilizados para obter a máxima estabilidade possível da célula. O equipamento utilizado para as medições foi o potenciostato modelo AUTOLAB PGSTAT302N com armazenamento e tratamento de dados realizados no software NOVA 2.1. A determinação do potencial a ser utilizado nas medidas de impedância foi realizada por VC num intervalo de potencial de -2V a 0V e de 0V a 2V^{121 122}.

Através do voltamograma obtido, foi possível verificar a região de maior resposta de corrente, com a menor variação de potencial, ou seja, a região de maior linearidade do voltamograma¹⁰³. Uma vez obtido o valor, este foi inserido como BIAS (também chamado de potencial DC) para as medidas de liberação por EIS. O intervalo de frequência utilizado foi entre 10^5 e 10^{-1} Hz, potencial de 1,1 V (BIAS) e uma amplitude de 20 mV. Durante as medições de impedância *in situ* continuamente não houve troca de líquido, ou seja, a PBS adicionada no início da medição se manteve até o final do experimento.

Os resultados obtidos passaram por *fitting* com a ajuda do software NOVA versão 2.1 para determinação dos valores dos elementos dos circuitos equivalentes (CE's), que melhor representam os fenômenos que ocorrem durante o teste de liberação com a aplicação de potencial¹²³. Os *fitting's* realizados na solução devem ser convergentes, tanto quanto possível, com valores baixos de X^2 (fator que se relaciona com o quão próximo do espectro obtido, como resultado de medida, um *fitting* está).

Assim como ocorreu para UV-Vis, medições de impedância foram realizadas em soluções conhecidas para posterior obtenção da curva de calibração. A curva relaciona R_p , que foi retirada dos CE's dessas soluções com essas concentrações conhecidas. Nessa curva, os valores de $\text{Log}(R_p)$ são representados no eixo "Y" e os valores de concentração são representados no eixo "X".

Depois de obtida a curva de calibração das medições por EIS, foi possível determinar a equação da reta e, por fim, relacionar os valores de R_p de cada concentração desconhecidas com sua respectiva concentração. O perfil de liberação, para as medições por EIS, foi obtido relacionando quantidade de fármaco liberado em solução e intervalo de tempo em horas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterizações do α -TCP

5.1.1 Influência dos Fármacos e do Teste de Liberação na Formação das Fases no Cimento

As análises de DRX foram realizadas com o intuito de verificar a influência dos fármacos e do teste de liberação na formação das fases no cimento, o que poderia afetar o processo de liberação devido, por exemplo, à diferença de solubilidade entre os fosfatos de cálcio possíveis de se formar após a interação com esses fármacos. As fichas adotadas nas identificações dos picos característicos das fases foram as fichas de número 00-009-0348, 00-029-0359 (α -TCP), 00-009-0169 (β -TCP) e 00-009-0432 CDHA[Ca₉(HPO₄(PO₄)₅OH)] que foram retiradas do *International Centre for Diffraction Data* (ICDD).

Depois de prontos os corpos de prova com e sem fármacos, antes e após liberação, os pós das amostras desses materiais foram levados ao difratômetro para verificação das fases presentes em cada grupo. A Figura 18 mostra os difratogramas para o pó utilizado na preparação dos corpos de prova (Pó CFC-C), o controle antes da liberação (CFC-C Pré), controle pós-liberação (CFC-C Pós), cimento com CL antes (CFC-L Pré) e pós-liberação (CFC-L Pós), cimento com SG antes (CFC-G Pré) e pós-liberação (CFC-G Pós).

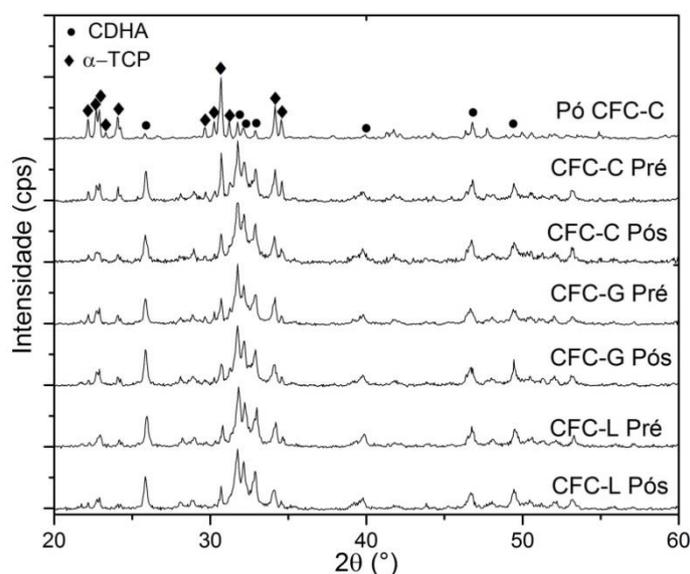


Figura 18 – Difratogramas de pós de cimento da fase α -TCP.

A formação de CDHA, representada na imagem pela fase HAp, tanto nas amostras pré-teste de liberação, quanto nas amostras pós-teste de liberação são atribuídas à reação de hidrólise que ocorre entre cimento e líquido, quando esses dois são colocados em contato. O resultado desse fenômeno é o aumento da presença dessa fase como pode ser observado pela presença de picos mais intensos de CDHA para as amostras que foram colocadas em contato com líquido em comparação com a amostra do pó de CFC-C²⁵. No caso dos resultados anteriores ao teste, o contato ocorre durante a mistura entre líquido e pó com reação de pega na preparação dos corpos de prova e na exposição dos corpos de prova desmoldados ao ambiente de 100% de umidade por 72 horas. Já no caso dos resultados posteriores ao teste de liberação, além desses momentos o cimento é imerso em PBS durante todo o teste, o que aumenta ainda mais a quantidade dos cristais de CDHA.

Após análise dos difratogramas obtidos, foi possível concluir que não houve influência significativa, tanto dos fármacos quanto do teste de liberação na formação de fases, porque as fases resultantes em todos os corpos de prova foram a CDHA e a fase α -TCP, assim como já observado em literatura^{25,124}.

5.1.2 Tamanho Médio e Distribuição Granulométrica das Partículas

A granulometria do cimento tem influência direta sobre a porosidade dos corpos de prova, injetabilidade, fluidez, dentre outros parâmetros^{3,63,125,126}. Por isso, informações sobre essa distribuição são de grande importância para a devida correlação com propriedades do material estudado.

O tamanho de partícula influencia também na morfologia dos cristais de CDHA formados como já mencionado na seção 3.4. Pós com menor tamanho de partícula facilitam a formação de cristais de CDHA na forma de agulhas, devido à maior facilidade de dissolução desse pó, como consequência da maior área superficial disponível para a reação de hidrólise, quando do contato com o meio aquoso. No caso das partículas maiores, a velocidade de dissolução menor devido à menor área superficial, facilita a formação de cristais na forma de placas petaloides³.

As informações sobre as dimensões das partículas do pó de CFC são mostradas na tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição de tamanho de partículas do pó de cimento da fase α -TCP

Diâmetro (μm)	
Menor que	Pó CFC moído manualmente
Diâmetro a 10%	1,37
Diâmetro a 50%	9,97
Diâmetro a 90%	24,74
Diâmetro médio	11,78

A distribuição do tamanho de partículas do tipo bimodal, mostrada na figura 19, foi obtida da análise do pó do cimento de fosfato tricálcico utilizado no presente estudo.

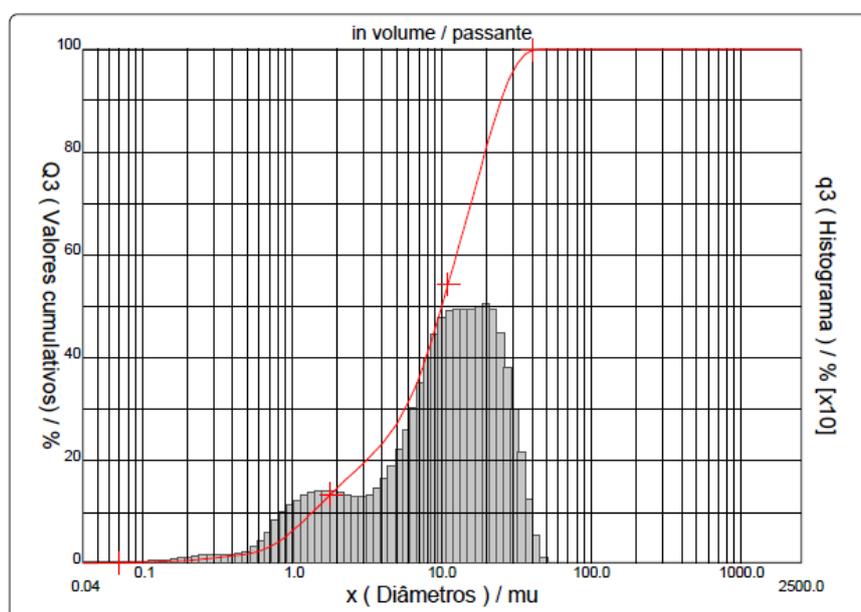


Figura 19 - Distribuição granulométrica do cimento α -TCP após moagem manual e peneiramento em peneira malha ABNT 325#.

Essa distribuição, com tamanho médio de partícula, é importante para o controle da quantidade de líquido utilizada durante a preparação da pasta cimentícia. Redução no tamanho de partícula possibilita aumento da relação L/P aplicada para a preparação da pasta cimentícia ^{7,8}.

Esse tipo de distribuição bimodal de partículas possibilita, em tese, um melhor preenchimento dos vazios entre as partículas maiores, o que tem efeito sobre a resistência do material também, pois reduz a porosidade.

5.1.3 Densidade Aparente, Porosidade Total, Porosidade Aparente e Absorção do Líquido.

Os valores de P, PA, DA e AbL foram obtidos de amostras CFC-C Pré, CFC-G Pré e CFC-L Pré. Foram 15 amostras no total, sendo 5 para cada grupo (CFC-C Pré n = 5, CFC-G Pré n = 5 e CFC-L Pré n = 5).

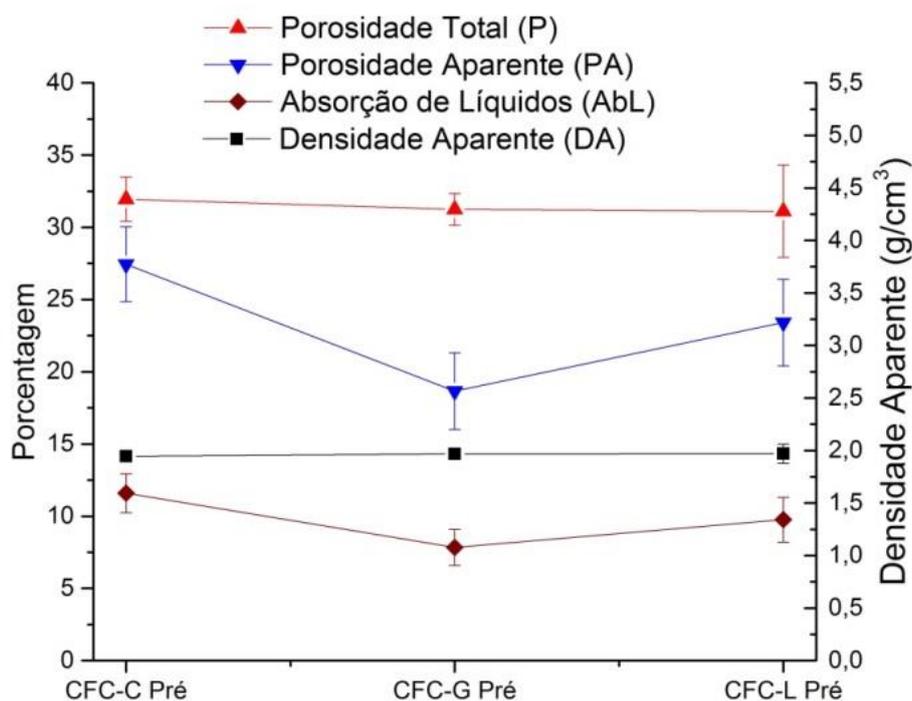


Figura 20 - Valores de P, PA, AbL e DA para as amostras CFC-C Pré, CFC-G Pré e CFC-L Pré.

A análise dos resultados mostrados na Figura 20 permitiu verificar algumas informações interessantes. A Porosidade Total (P) não variou muito para as três amostras, sendo a amostra CFC-C Pré a mais porosa e a CFC-L Pré a menos porosa. Supõem-se, pelo resultado, que a presença de CL tem efeito pequeno sobre a porosidade, apesar de influenciar nessa propriedade. Um efeito mais significativo sobre a porosidade é observado por Colpo ⁷, onde se observou redução da porosidade total pela ação do CL e do SG.

Na análise dos resultados relacionados à porosidade aparente (PA) mostrou que, esses valores para CFC-L Pré e CFC-G Pré foram diferentes da amostra CFC-C Pré. A presença dos dois tipos de fármaco (SG e CL) promove a redução desses valores com um maior efeito relacionado ao SG, que teve uma redução de 32,04% no seu valor em comparação a amostra controle.

A Densidade Aparente (DA) mostrou um ligeiro aumento nas amostras com CL e SG, diferente do comportamento observado por Colpo em seus trabalhos ⁷, porém são considerados não apreciáveis quando comparado ao estudo analítico feito pelo autor. Para as amostras de CFC-G Pré ocorreu um aumento discreto no valor de DA, em comparação com CFC-C Pré, que passou de 1,946 g/cm³ para 1,970 g/cm³. A tabela 6 mostra a análise dos resultados obtidos de cada grupo de amostras.

Tabela 6 – Análise dos resultados de Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente e Absorção de líquido para os três tipos de amostras estudadas.

	Amostra	Densidade aparente (g/cm ³)	Porosidade aparente (%)	Porosidade total (%)	Absorção de líquido (%)
Mínima	CFC-C Pré	1,895	24,125	30,497	9,952
	CFC-L Pré	1,926	20,400	29,583	8,306
	CFC-G Pré	1,858	14,141	26,729	5,534
Médias	CFC-C Pré	1,946 ± 0,044	27,453 ± 2,592	31,944 ± 1,543	11,589 ± 1,344
	CFC-L Pré	1,970 ± 0,031	23,403 ± 2,647	31,119 ± 1,100	9,755 ± 1,246
	CFC-G Pré	1,967 ± 0,092	18,654 ± 3,003	31,241 ± 3,201	7,833 ± 1,554
Mediana	CFC-C Pré	1,957	26,556	31,585	11,073
	CFC-L Pré	1,969	23,735	31,166	9,887
	CFC-G Pré	1,987	20,000	30,536	8,240
Máxima	CFC-C Pré	1,988	30,328	33,743	13,051
	CFC-L Pré	2,014	27,273	32,666	11,613
	CFC-G Pré	2,096	21,277	35,024	9,174
Erro padrão	CFC-C Pré	0,020	1,159	0,690	0,601
	CFC-L Pré	0,014	1,184	0,492	0,557
	CFC-G Pré	0,041	1,343	1,432	0,695
Variância	CFC-C Pré	0,002	6,717	2,381	1,806
	CFC-L Pré	0,003	14,152	3,881	3,784
	CFC-G Pré	0,003	18,380	3,538	4,658
Coeficiente de Variância	CFC-C Pré	0,002	22,918	3,084	5,485
	CFC-L Pré	0,001	29,537	3,952	6,965
	CFC-G Pré	0,001	7,005	1,211	1,552

A absorção de líquidos (AbL) nas amostras se alterou de maneiras diferentes, de acordo com a amostra analisada. Para as amostras CFC-G Pré houve uma redução considerável no valor de AbL, comparado com a amostra CFC-C Pré,

com diminuição em torno de 32,41 %. Nas amostras CFC-L Pré houve uma redução da AbL que se variou em aproximadamente 15,82 %.

5.1.4 Efeito da Presença de Fármacos sobre a Resistência à Compressão Axial

O ensaio de compressão foi realizado para os grupos de amostras pré teste de liberação *in vitro* e pós teste dos três grupos de amostras (CFC-C, CFC-G e CFC-L). Foram ensaiadas 5 amostras (n=5) de cada grupo, totalizando um conjunto de 30 amostras (N=30)⁵. De modo geral, as resistências de todas as amostras estudadas nesse trabalho estão com média acima de alguns trabalhos utilizados como base do presente estudo^{6,7}. Essa maior resistência pode ser atribuída à maior densidade que essas amostras possuem, em comparação a outros cimentos α -TCP, como pode ser observado nos resultados de determinação de densidade (seção 5.1.3). Na figura 21 é possível visualizar os resultados obtidos para cada tipo de amostra. Para a amostra CFC-G, diferentemente do que acontece com as demais amostras, ocorreu uma redução da resistência com o passar do tempo, Esse resultado sugere uma maior influência da presença do fármaco sobre a resistência mecânica do cimento, levando em consideração que para o CL o aumento da resistência mecânica, com o passar do tempo de imersão em PBS, ocorreu como esperado.

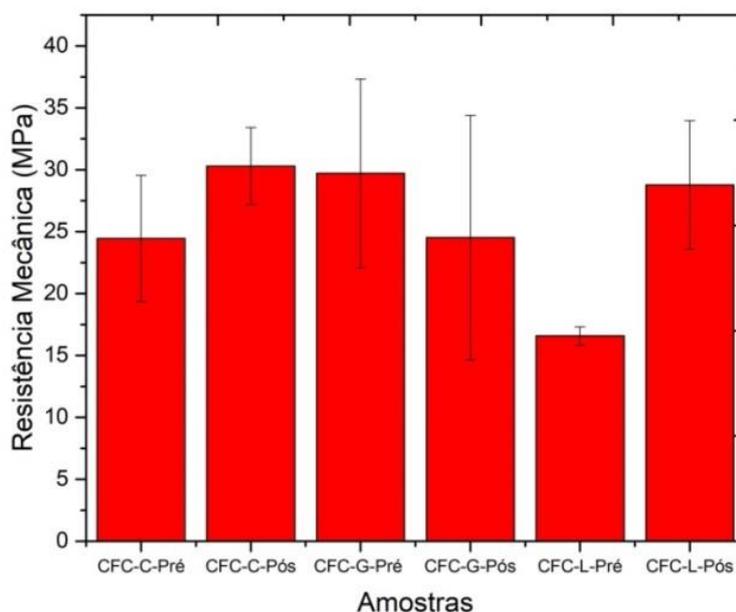


Figura 21 - Resultados ensaio de resistência mecânica à compressão.

Também é possível concluir através da análise da figura 21, que a presença do analgésico local cloridrato de lidocaína (CL) tem efeito sobre a resistência mecânica do cimento, tendo em vista que os valores dessas amostras não se mantiveram proporcionais aos valores de resistência à compressão das amostras controle (CFC-C Pré e CFC-C Pós), apesar de ter ocorrido um aumento da resistência pós-teste de liberação, como se observa para a amostra CFC-C.

A porcentagem de fármaco é algo de extrema importância para um controle de propriedades mecânicas. Essa porcentagem tem relação direta com a resistência do material, como pode ser observado nos resultados supracitados ⁴⁶.

A presença dos fármacos mostrou um controle direta sobre as propriedades mecânicas do cimento, influenciando nos valores de resistência, tanto nas amostras pré quando nas amostras pós ⁴⁶. O tempo de exposição ao meio aquoso também tem efeito direto sobre a resistência desses materiais, por proporcionar maior geração de CDHA que, por sua vez, tem papel importante nessas propriedades.

No trabalho utilizado como referência observou-se uma maior variação da resistência mecânica para os resultados pós teste de liberação em comparação

com os testes pré. As variações entre resultados pré e pós foram mais significativas para as amostras sem fármaco (349,66%), seguidas das amostras CFC-L (178,50%) e CFC-G (102,91%) ⁷. A comparação com as amostras do presente estudo foram inconclusivas, pois o comportamento é completamente diferente do observado por Colpo ⁷. As amostras com maior variação na comparação entre pré e pós para o trabalho em questão foram as amostras CFC-L (73,63%), seguidas das amostras CFC-C (23,90%) e das amostras CFC-G (17,51%).

O fato de as amostras utilizadas por Colpo possuírem uma maior porcentagem de fármacos influenciou também nessa diferença. Maior porcentagem de fármaco significa maior porosidade quando da liberação desses fármacos, e com isso tem-se uma maior área superficial disponível para que a reação de hidrólise ocorra durante o contato do cimento com a solução.

5.1.5 Influência dos Fármacos sobre a Microestrutura do α -TCP

As imagens de MEV foram realizadas com o intuito de comparar o CFC sem fármaco (CFC-C) com os cimentos com SG e com CL, buscando verificar a influência de cada um dos fármacos na morfologia do cimento como, por exemplo, sua atuação sobre a nucleação e crescimento dos cristais de CDHA, além de verificar o efeito do fenômeno de liberação sobre as amostras. Os cristais de CDHA, com sua morfologia específica, agem diretamente sobre a resistência mecânica do cimento, podendo também influenciar na cinética de liberação do fármaco, resultando em mais uma variável e alterando o processo de liberação. ⁵. Na figura 22 é possível visualizar as imagens das fraturas dos dois grupos de amostra (Pré e Pós teste).

Os cristais de CDHA já estavam presentes no cimento antes do teste de liberação *in vitro*, como pode ser observado nos resultados de DRX e também nas imagens de MEV, com registros pré-teste (Fig. 22a, Fig. 22c e Fig. 22e).

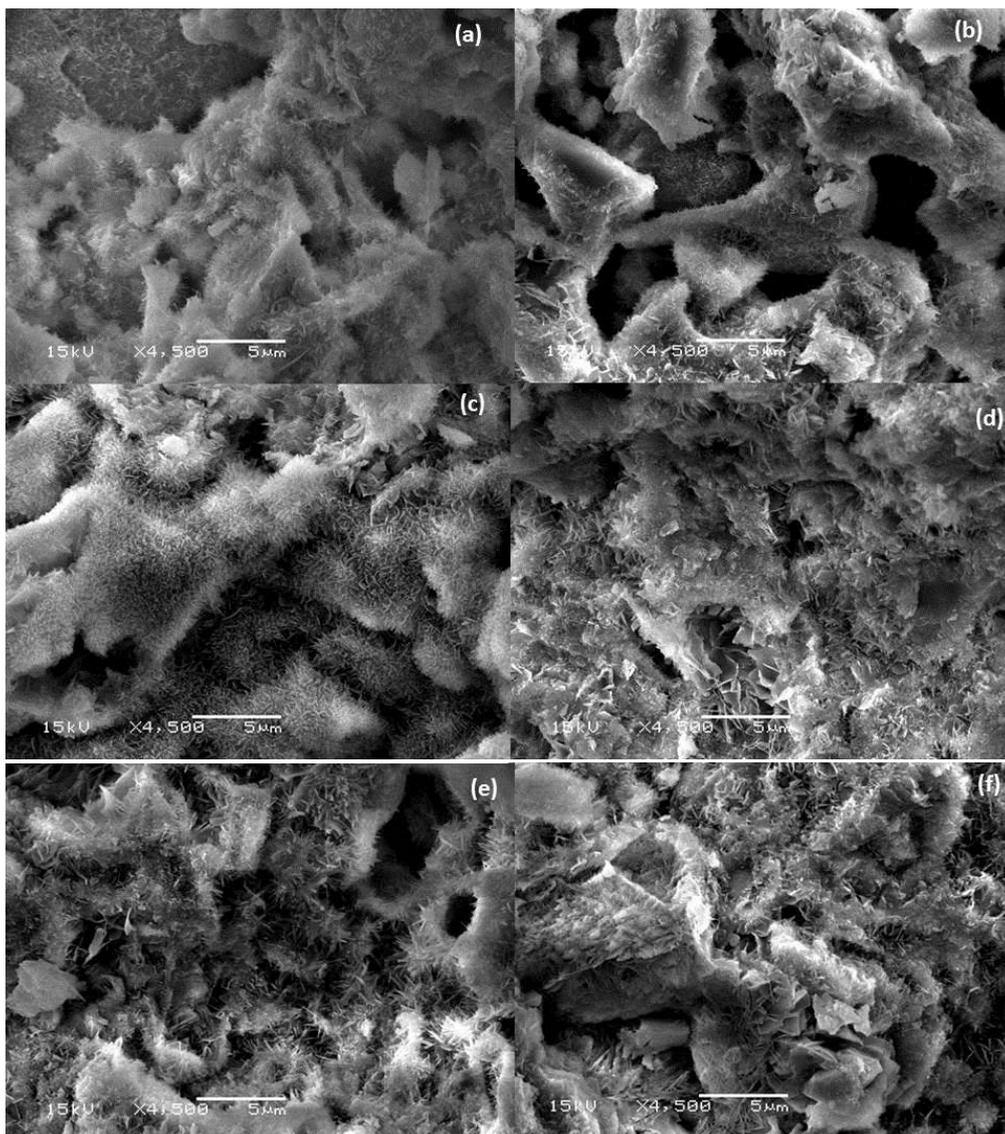


Figura 22 – Imagens obtidas por MEV das amostras de (a) CFC-B Pré, (b) CFC-B Pós, (c) CFC-G Pré e (d) CFC-G Pós, (e) CFC-L Pré e (f) CFC-L Pós.

Os corpos de prova pós-teste apresentam um maior tamanho de cristais devido à exposição ao PBS por um longo tempo (15 dias), o que provoca reação de hidrólise com a formação de CDHA por mais tempo que no caso dos cimentos pré-teste. Os poros presentes nas imagens são consequência, dentre outros fatores, da relação L/P de cimento. A maior relação L/P leva a uma maior porosidade da amostra ^{3,63}. As agulhas e placas petaloides presentes nas imagens tem seu efeito sobre a resistência mecânica do cimento, comprovado pelos resultados do ensaio de resistência à compressão axial, que mostraram aumento da resistência mecânica do cimento após realizado o teste de liberação *in vitro* para as amostras CFC-C e CFC-L (vide seção 5.4.1) ⁵⁰.

A morfologia do presente estudo se difere um pouco, em comparação com a morfologia encontrada por Colpo *et al*⁷, tendo em vista, dentre outros fatores, o tamanho médio de partícula do pó utilizado pelo autor em seus trabalhos. Colpo conseguiu um tamanho médio de partícula por volta de 13,10 μ m enquanto nesse trabalho o tamanho médio foi de 11,78 μ m (vide seção 5.1.2). Tendo em vista o fato de que quanto menor o tamanho de partícula, maior a formação de agulhas, em comparação com a ocorrência de placas petaloides, as imagens mostradas na figura 22 possuem uma maior presença de agulhas. No entanto, esse fato não exclui o aparecimento de placas, que aparecem também para todos os tipos de amostras desse estudo³.

5.2 Seleção do BIAS por Voltametria Cíclica em PBS

A imagem 23 mostra os voltamogramas obtidos para um intervalo de 0V até 2V para a PBS pH 7,4. A medição foi realizada para determinação do BIAS, que é uma média entre o potencial de oxidação e o potencial de redução, também chamado de potencial de meia-onda como uma caracterização complementar, sem que isso fosse algo fundamental ao estudo¹⁶. Assim, é possível trabalhar com um potencial de meia-onda que proporciona uma resposta de corrente satisfatória com uma mínima variação de potencial, resultando no comportamento característico da região linear de um voltamograma. Com isso, pode-se promover a mínima perturbação na amostra, reduzindo a ocorrência de perfis de impedância ruidosos ou com outros tipos de interferências.

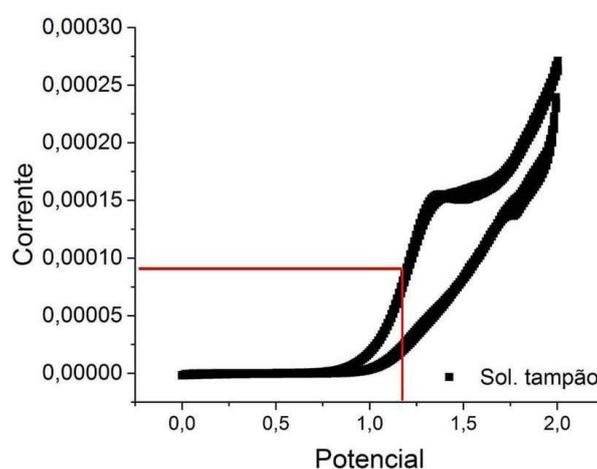


Figura 23 - Voltamograma de PBS com 30 ciclos de medições.

O valor encontrado, após a realização dos 30 ciclos de voltametria, foi de aproximadamente 1,1 V. O potencial de meia-onda foi calculado pela média entre os valores dos picos de oxidação e de redução ^{109,116}. Esse valor foi o valor utilizado como BIAS para as medições de impedância.

5.3 Padronização do Teste de Liberação de Fármacos por EIS

5.3.1 Influência da Variação de Amplitude (potencial AC) sobre a Liberação de Fármacos

Antes de iniciar os testes de liberação com os corpos de prova, várias medições foram realizadas com PBS, promovendo a variação de amplitude de potencial em corrente alternada, a região de linearidade e também valores de impedância com menor interferência. Essa medida possibilita maior precisão de medições com redução de dispersões, possibilitando obtenção de espectros mais contínuos e CE's mais precisos. As amplitudes (volts em corrente alternada) utilizadas variaram de 10 mV até 50 mV ^{94,127,128}.

Os diagramas de Nyquist da Figura 24 apresentam os resultados de medições de impedância em PBS sem cimento, com variação da amplitude de potencial aplicada sobre o sistema. Os valores maiores que 20 mV de amplitude não foram utilizados para as medições posteriores com amostra de CFC e fármacos, apesar de apresentarem estabilidade semelhante aquela obtida nas medições com 20 mV, buscando promover a menor perturbação possível no sistema e mantendo linearidade das medições. A perturbação aumenta com o aumento do valor de amplitude de potencial ¹⁰³.

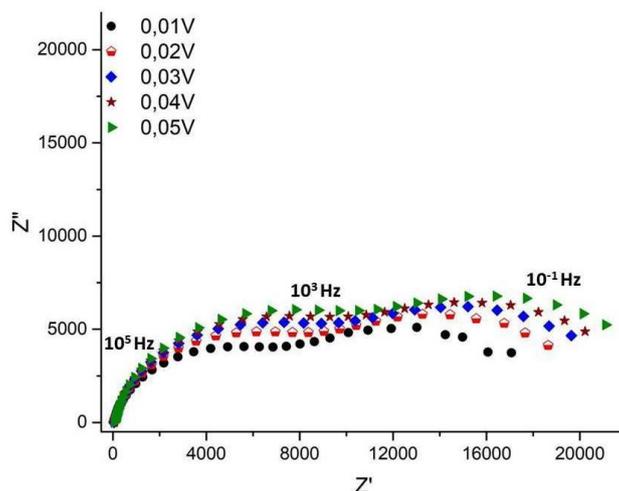


Figura 24 - Diagrama de Nyquist com variação de amplitude para solução tampão
* Biais de 1,11 V, frequência de 10^{-1} a 10^5 Hz.

É possível verificar na figura 24 uma ocorrência significativa de dispersões em baixas frequências, especialmente para o resultado utilizando 10mV de amplitude. Esse motivo também influenciou a escolha da amplitude de 20mV para realização das medições de impedância. A menor amplitude tende a promover menor perturbação sem deixar de lado a limitação de dispersões, mais comumente ocorridos em baixas frequências, à medida que a amplitude de perturbação é reduzida. Além disso, a linearidade dos resultados é favorecida pela utilização de baixas amplitudes de sinal de potencial ¹⁰³.

5.3.2 Variação de BIAS

Após a determinação da amplitude de potencial aplicada como valor de amplitude, foi realizada a variação nos valores do potencial DC. Essa variação foi realizada com o intuito de verificar o comportamento do eletrólito (PBS) durante a variação desse parâmetro, buscando a confirmação do valor de BIAS satisfatório para utilização como padrão nas medições de EIS de CFC com e sem fármacos. A verificação do comportamento da solução com a mudança do valor de BIAS se faz necessária, devido à influencia que esse parâmetro tem sobre os fenômenos eletroquímicos como, poderá ser observado nos resultados ¹⁰³.

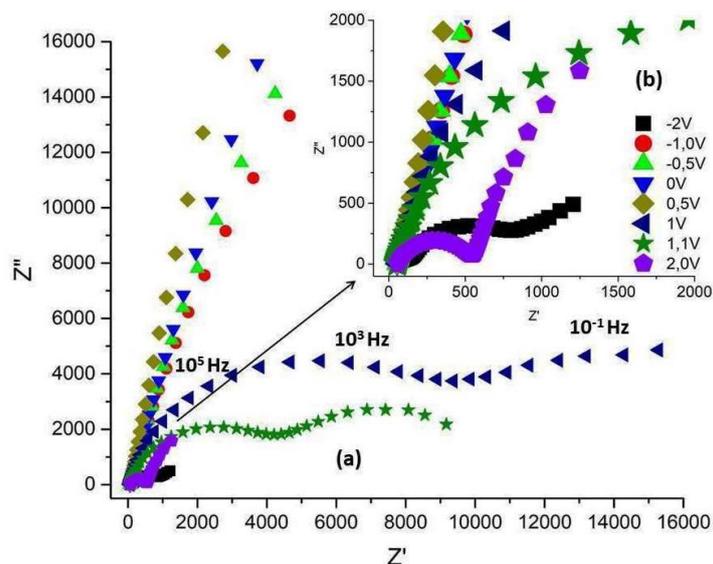


Figura 25 - Diagramas de Nyquist para variações de BIAS para medições de impedância em solução tampão de (a) -2 V até -2 V e (b) ampliação dos resultados em altas frequências.

A Figura 25 mostra diagramas de Nyquist para variação do BIAS em um mesmo intervalo de frequência que varia de 10^{-1} Hz até 10^5 Hz. Os valores de BIAS variam de -2 V até 2 V numa amplitude de potencial AC de 20mV. Com esses resultados foi possível verificar a ocorrência de fenômenos que são facilitados ou dificultados, de acordo com o valor de potencial DC que é aplicado.

No início das medições com BIAS negativo (-2V), tem-se uma maior transferência de carga, que se confirma pelos valores baixos de resistência encontrados no primeiro semicírculo nos potenciais de -2,0V a -1,4V. Nos potenciais por volta de -0,5 V esse semicírculo desaparece, podendo significar um aumento da resistência relacionada á transferência de carga (R_{CT}). Quando o valor de potencial aproxima-se de 0 V, a resistência total (R_T) não sofre variações bruscas em seu valor, tendo o espectro do diagrama um formato semelhante nos espectros mostrados a partir desse valor de BIAS. Esse comportamento se mantém até os potenciais próximos de 0,5 V, em que é possível verificar uma redução significativa nos valores de resistência dos diagramas obtidos, o que pode ser resultado de uma aproximação da região linear de medições, onde pequenas variações de potencial geram respostas de corrente expressivas. Os valores de resistência são mais baixos nos intervalos de 1,1 V e 1,2 V, o que significa que essas medições já se encontram na região

linear para as medidas do sistema estudado ¹⁰³. Através da análise do voltamograma representado na Figura 23 (seção 5.2), foi possível confirmar a informação supracitada sobre a região de linearidade. A imagem possibilita observar o valor do potencial de meia-onda, estando de acordo com os valores com maior resposta de corrente obtidos com a variação do BIAS, justificando a utilização desse valor nas medições de impedância durante os testes de liberação.

5.3.3 Influencia da Injeção de Nitrogênio sobre os EIS

Outro teste realizado foi com a utilização de gás inerte (N_2) visando uma redução nos fenômenos de oxidação que ocorrem durante as medições como já mencionado ¹²⁹. O teste foi realizado com injeção de N_2 e sem injeção de N_2 para verificar os efeitos desse gás sobre os resultados de impedância para uma vazão de gás abaixo de 0,2 psi. Os diagramas de Nyquist obtidos são mostrados na Figura 26. Os valores sem injeção de N_2 mostram uma maior estabilidade, em comparação com os valores com injeção, principalmente nas baixas frequências, onde essa variação é bem visível.

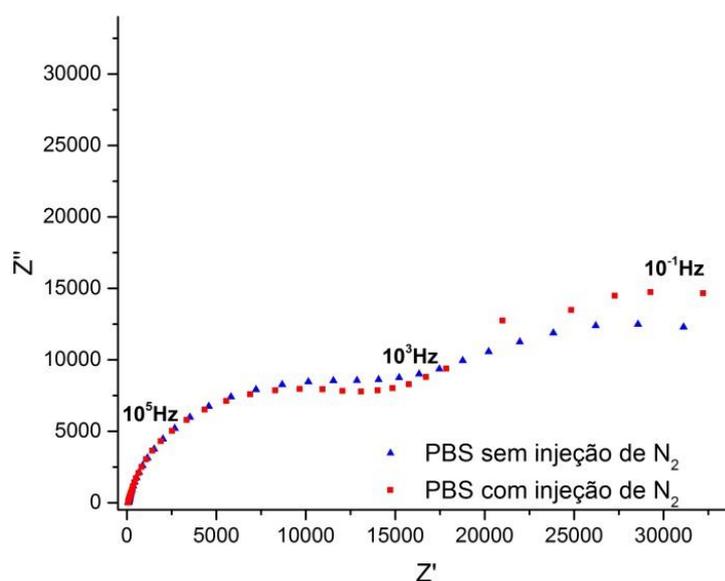


Figura 26 - Medições de impedância em PBS realizadas com e sem N_2 utilizando Bias de 1,11 V, amplitude de 20 mV e frequência de 10^{-1} a 10^5 Hz.

A descontinuidade do gráfico só se encontra em baixas frequências porque, á título de verificação do comportamento do sistema, a vazão se manteve zerada

até certo momento da medição, em que foi aberta e a interferência nos valores de resistência foi observada.

Levando em consideração os resultados encontrados na comparação das duas situações, a injeção de N_2 com utilização de gás inerte foi descartada durante a padronização do método de medições de liberação de fármacos utilizando EIS. A instabilidade encontrada nos resultados de impedância com agitação pode ser, dentre outros fatores, ocasionada pela dificuldade de controle de vazão durante a realização das medições.

A injeção de N_2 , seguida da vedação da célula eletroquímica, para realização das medições, não foi realizada porque os cortes feitos na tampa de cortiça, para fixação dos eletrodos, dificultaram a vedação necessária para que o gás se mantenha dentro da célula eletroquímica durante toda a medição. Esse seria um meio satisfatório para evitar uma injeção de gás durante o teste de liberação *in vitro*, sem deixar de garantir a presença do gás dentro da célula.

5.3.4 Análise da Agitação Magnética (AM)

A agitação magnética foi utilizada nesse trabalho, tendo em vista a necessidade de promover uma movimentação contínua das espécies que estão dispersas em solução, para controlar o efeito de acúmulo dessas espécies na interface eletrodo/eletrólito, além de reduzir a ocorrência de decantação dessas espécies com o passar do tempo. A Figura 27 mostra os diagramas de Nyquist obtidos das médias das medições de impedância em triplicata de PBS, em ambientes com e sem AM.

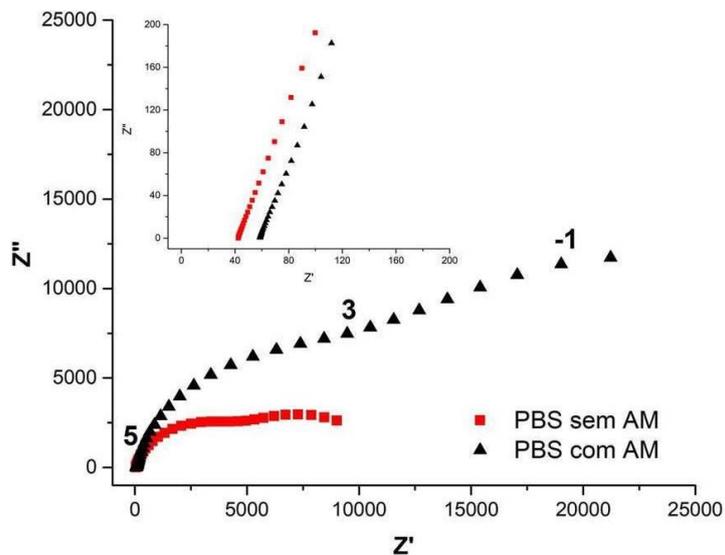


Figura 27 - Medições de impedância solução tampão realizadas com e sem AM. * Bias de 1,11 V, amplitude de 20 mV e frequência de 10^{-1} a 10^5 Hz.

Pela análise da figura é possível verificar que a AM promove um aumento nos valores de resistência, especialmente em baixas frequências. É possível observar pelos resultados uma menor influência com relação à geração de dispersões nesses valores de resultados, quando comparados com as medidas com agitação por injeção de N_2 .

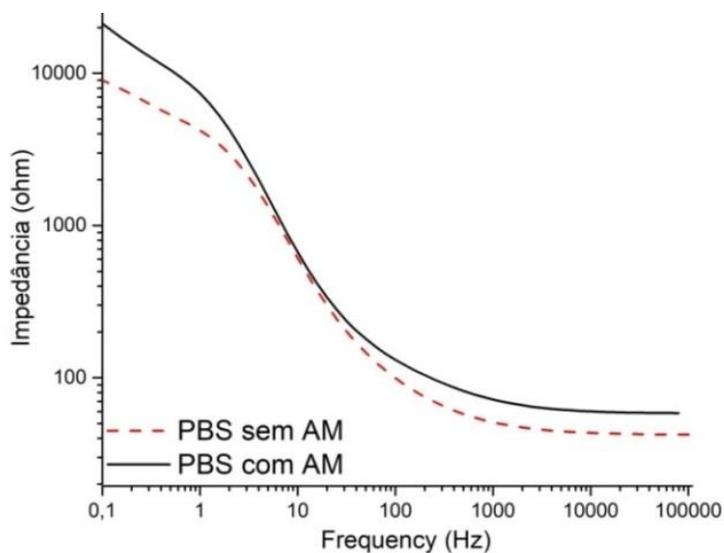


Figura 28 - Diagrama de Bode para PBS com e sem AM.

A influência mais perceptível da AM, sobre os valores de impedância em baixas frequências, pode ser observada pela análise da Figura 28. Essa figura apresenta relação entre frequência aplicada e valores de impedância para PBS

com e sem AM, possibilitando observação da variação dos valores de impedância à medida que os valores de frequência aumentam.

Apesar do aumento nos valores de impedância (Z), desde as baixas frequências até as altas, a diferença entre os valores de Z para os resultados com e sem AM é maior em baixas frequências, como pode ser observado pelo tamanho da área entre as linhas na região de baixas frequências, comparada com os valores em altas frequências. O aumento médio nos valores de impedância, devido à utilização de AM durante as medições foi de, aproximadamente, 12 %, devido à utilização de AM durante as medições. Essa maior influência da AM em baixas frequências pode estar ligada aos fenômenos comumente perceptíveis nessa região, como a resistência à polarização, que será discutida mais a frente. Na região de altas frequências, os fenômenos eletroquímicos comumente observados, são ligados à transferência de carga, que parece sofrer menos com o aumento da movimentação de espécies.

Também foi possível observar a influência da AM sobre o efeito de decantação de espécies e acúmulo das mesmas na interface eletrodo/eletrólito, que ocorre durante o teste de liberação com o passar do tempo. Os diagramas de Nyquist mostrados na Figura 29 são médias dos resultados treze triplicata para amostras de CFC-C em ambientes sem AM (Fig. 29a) e com AM (Fig. 29b). É possível verificar aumento nos valores de resistência para os resultados com AM.

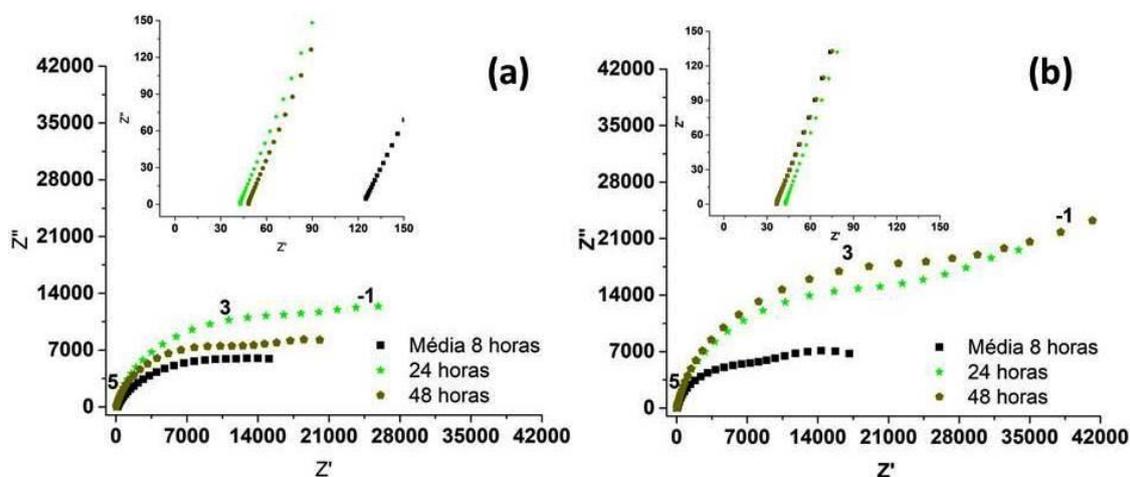


Figura 29 - Medições de impedância de CFC-C realizadas (a) sem AM e (b) com AM. * Bias de 1,11 V, amplitude de 20 mV e frequência de 10^{-1} a 10^5 Hz.

A AM foi escolhida como método de movimentação das espécies dispersas em solução, devido à sua menor interferência com relação à geração de dispersões, fato que poderia se tornar um problema durante o tratamento de dados pós-medidas. A interferência da AM sobre os valores de resistência pode ser eliminada, realizando uma medição com a amostra controle e com a posterior subtração dos valores de impedância obtidos com a amostra controle, dos resultados obtidos com as amostras com fármacos.

5.3.5 Medições de PBS *versus* Medições de CFC-C Imerso em PBS

Além da verificação do efeito da AM sobre a movimentação de espécies em solução, foi verificada a influência da presença de íons de Ca^{2+} e de PO_4^{3-} (provenientes do CFC) nas propriedades elétricas do sistema. A Figura 30 mostra os diagramas de Nyquist relacionados a essa influência. Nela é possível observar que a presença do cimento, reduzindo a resistência, tem esse efeito minimizado pela movimentação das espécies num ambiente com AM. Essa movimentação pode ter causado aumento na concentração de espécies próximo à interface eletrodo/eletrólito, o que aumenta o efeito desses íons sobre os fenômenos eletroquímicos e, conseqüentemente, sobre os valores de impedância.

Os íons provenientes da PBS são H^+ , OH^- , Na^+ , $[\text{HPO}_4]^{2-}$, $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ e Cl^- , sendo os dois primeiros os mais abundantes nessa solução. A AM parece favorecer a adsorção desses íons na superfície do eletrodo de platina, por evitar a decantação dessas espécies, como consequência da movimentação das mesmas, como já observado na seção anterior.

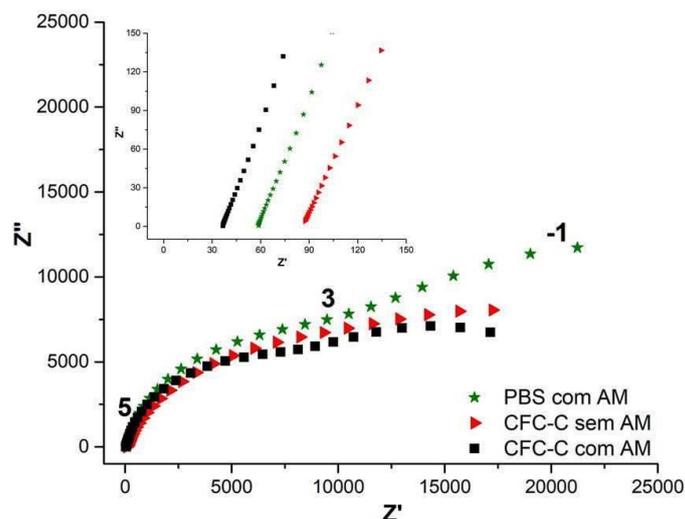


Figura 30 - Diagrama de Nyquist para medições de impedância de PBS e PBS com CFC-C realizadas com AM. * Biais de 1,11 V, amplitude de 20 mV e frequência de 10^{-1} a 10^5 Hz.

Nos estudos em ambientes aquosos, a camada de íons que se forma, por adsorção na superfície do eletrodo, é o plano interno de Helmholtz ¹⁰³. A adsorção desses íons, juntamente com o congestionamento de espécies em ambiente sob AM, promove uma redução na condutividade do sistema, como pode ser observado nos resultados com maior resistência para PBS em AM ^{103,111}.

Quando os íons do cimento (Ca^{2+} e PO_4^{3-}) estão dispersos em solução, ocorre uma redução na resistência do sistema, fato que se observa nos mesmos diagramas de Nyquist. A redução pode estar ligada à maior formação de dipolos entre os íons de PBS e os íons de CFC, o que dificulta a formação da dupla camada elétrica, que tem grande influência sobre a resistência do sistema.

A Figura 31 apresenta a relação impedância versus frequência, mostrando que a presença dos íons de cimento aumenta a impedância do sistema em altas frequências e favorece os fenômenos de altas frequências, quando em AM. Nos resultados de PBS, comparados com os resultados de CFC-C, ambos em AM, ocorre redução de aproximadamente 2,98% nos valores de impedância.

A hipótese de justificativa para esses fenômenos seria a influência da presença dos íons de CFC-C em altas frequências ser muito mais significativa, do que em baixas frequências, haja vista a distância entre as curvas de CFC-C e PBS em AM para as duas regiões no gráfico.

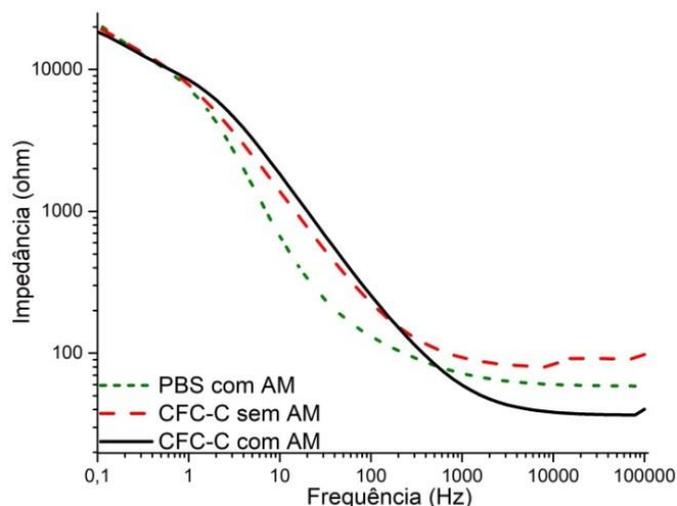


Figura 31 - Diagrama frequência *versus* impedância para PBS, CFC-C com AM e CFC-C sem AM.

As comparações entre os ambientes, com e sem presença de cimento de fosfato de cálcio, permitiu verificar os efeitos da presença dos íons de CFC-C em PBS. Também permitiu observar como ocorreu a influência desses íons em cada região de frequência. Assim foi possível correlacionar os resultados obtidos, verificando em quais fenômenos a presença dos íons de Ca^{2+} e PO_4^{3-} tem maior participação.

Os resultados mostram que a presença dos íons originados do cimento promove a redução da resistência do sistema, tendo seu efeito favorecido pela AM. Mais exclusivamente, os efeitos da presença desses íons são mais sentidos nas regiões de altas frequências, sugerindo um favorecimento dos fenômenos eletroquímicos observados nesses intervalos de frequência como, por exemplo, fenômenos de transferência de carga elétrica.

5.4 Liberação de Fármacos

5.4.1 Perfil de Liberação *in Vitro* por UV-Vis

O perfil de liberação para cada tipo de fármaco estudado foi obtido da curva de calibração, determinada após medições de absorvância e impedância, com concentrações conhecidas de cada fármaco e que deram origem às equações da reta para cada fármaco e a seus respectivos coeficientes de determinação

(R^2)^{7,130}. A tabela 7 apresenta as equações das curvas de calibração obtidas por UV-Vis para cada fármaco e seus respectivos valores de coeficiente de determinação (R^2).

Tabela 7 - Equações e R^2 obtidas das curvas de calibração por UV-Vis para CFC-G e CFC-L.

FÁRMACO	Equação da reta	R^2
Sulfato de Gentamicina	$y = 0,07607x$	0,99983
Cloridrato de Lidocaína	$y = 1,67384x$	0,99751

Os valores de R^2 se aproximam da unidade, como é de se esperar, para que os resultados sigam um perfil de linearidade, ou seja, com valores de absorbância variando na mesma proporção, com que os valores de concentração de uma dada solução^{130,131}.

Depois de obtidas as equações da reta, via curva de calibração, essas possibilitaram a obtenção das quantidades de fármacos liberados em solução com o passar do tempo. A Figura 32 mostra os perfis obtidos após realização de análises em triplicata das soluções amostrais durante 15 dias, utilizando a técnica de UV-Vis para SG (Fig. 32a) e para CL (Fig. 32b).

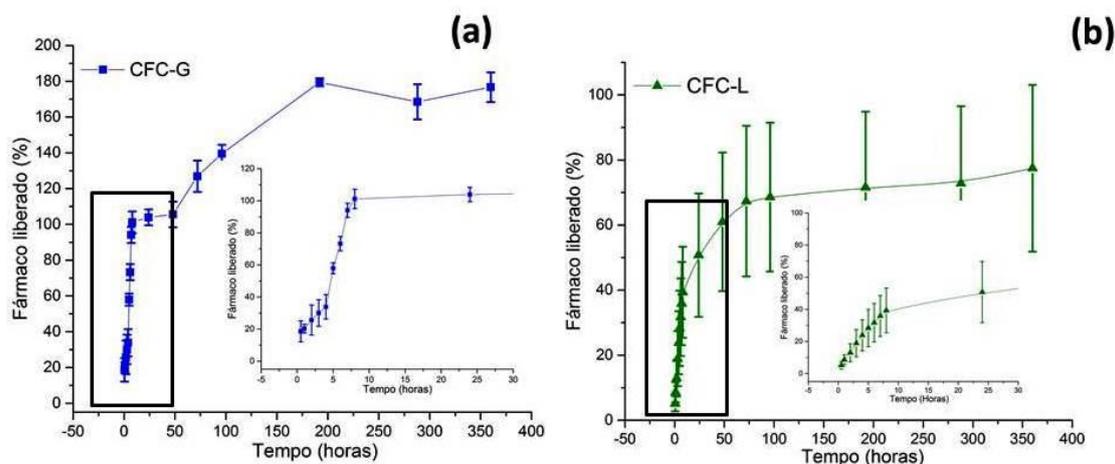


Figura 32 - Perfis de liberação de fármacos para as amostras (a) CFC-G e (b) CFC-L.

O perfil de liberação da amostra CFC-L (Fig. 32b) mostra um comportamento esperado para tais estudos, com quantidade significativa de liberação de fármaco em solução nas primeiras 8 horas devido ao efeito de explosão de liberação observado em muitos estudos de liberação^{9,25,132}.

Por outro lado, para a amostra CFC-G (Fig. 32a) não foi possível verificar coerência nos resultados, tendo em vista que a quantidade máxima de fármaco liberado excedeu os 100%. Esse fato, tendo em vista o limite de disponibilidade

desse medicamento em meio aquoso, sugere a possibilidade de interação entre SG e íons de PBS e/ou entre SG e íons de CFC-C, formando um composto que possui comprimento de onda de absorbância significativa de mesmo valor ou valor muito próximo ao comprimento de onda de maior absorbância que o SG. Outra possibilidade é que a quantidade de fármaco em solução esteja com uma concentração abaixo da quantidade mínima que proporciona uma medição sem muitas dispersões e de precisão aceitável. Isso pode estar relacionado ao baixo índice de percepção que esse fármaco possui em comparação com o CL, por exemplo. Logo, maiores quantidades de fármaco poderiam ser necessárias para que os valores de absorbância sejam maiores e, assim, essa absorbância seja mais facilmente percebida pelo equipamento.

5.4.2 Liberação *In situ* Continuadamente por EIS

Uma vez determinados a amplitude (20 mV), BIAS (1,1V), feita a escolha da influência de um ambiente com AM, sem injeção de gás inerte, e percebida a influência da presença do cimento de fosfato de cálcio no sistema; foram realizadas as medidas de impedância com a presença dos fármacos utilizados no trabalho. As caracterizações foram obtidas nos intervalos de 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 24h e 48h para as amostras CFC-C, CFC-G e CFC-L.

Os fenômenos de liberação foram estudados com o intuito de correlacionar presença de fármacos em solução, com variação do comportamento eletroquímico na interface eletrodo/eletrólito. A Figura 33 mostra os resultados para o experimento com comparações entre os diagramas de Nyquist (Fig. 33a) e relação frequência versus impedância (Fig. 33b) para cada tipo de amostra de cimento.

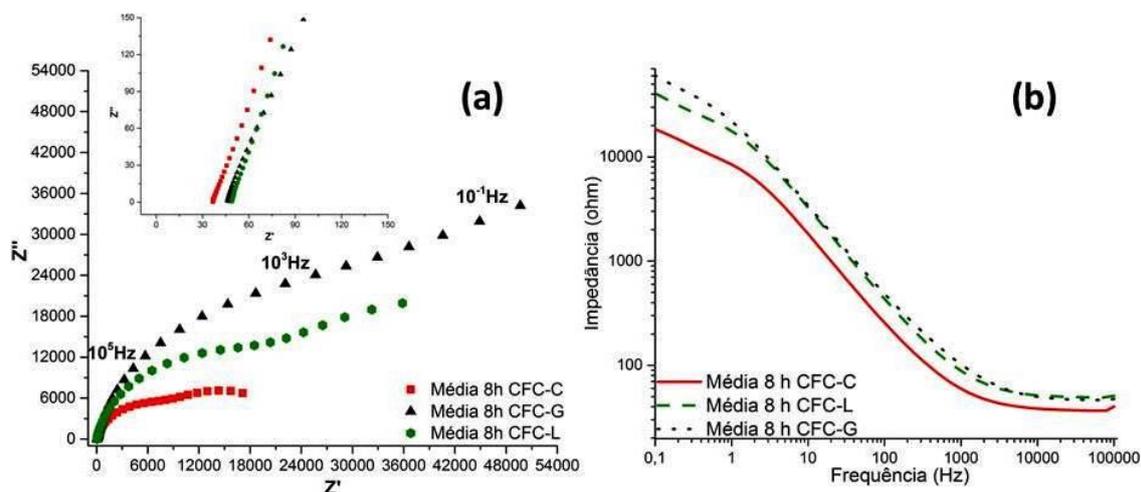


Figura 33 - Diagrama (a) de Nyquist e (b) de Bode para medições de impedância CFC-C, CFC-G e CFC-L realizadas com AM para médias de 8 horas.

Esses resultados são médias de medições feitas em triplicata para cada tipo de amostra num período de 8 horas. É possível verificar um aumento na resistência do sistema com a presença dos fármacos. A tabela 8 mostra a variação dos valores de impedância para cada amostra comparada com a amostra controle (CFC-C). Esses valores foram obtidos através da comparação entre as médias dos valores de impedância para cada amostras, ou seja, a média da amostra CFC-C foi comparada com a média de impedância das amostras CFC-G e CFC-L e assim foi possível verificar a diferença entre os valores dessas amostras.

Tabela 8 – Percentual de variação dos valores de impedância para CFC-G e CFC-L em comparação com CFC-C.

Amostra	Aumento nos valores de impedância (%)
CFC-C	-
CFC-G	94,05
CFC-L	68,68

A adição dos fármacos provocou um aumento significativo nos valores de impedância, como pode ser observado na tabela 8. No caso da amostra CFC-G, a presença de SG provocou um aumento de quase 100% nos valores de impedância. Essa variação nos valores de impedância foi atribuída à maior concentração de espécies em solução, promovendo uma maior dificuldade de movimentação de íons, o que tem efeito direto sobre a resistência do sistema.

A relação entre comprimento de cadeias e resistência também leva a essa conclusão. No caso do CFC imerso em PBS (CFC-C), as espécies dispersas

em solução são provenientes da própria solução e do cimento e possuem cadeias de tamanho moderado, se comparados com o comprimento das cadeias dos fármacos utilizados. Entre os fármacos, as diferenças de comprimento de cadeias também são significativas, sendo a cadeia do fármaco SG ($C_{60}H_{125}N_{15}O_{25}S$) mais extensa que a cadeia de CL ($C_{14}H_{23}ClN_2O$). Assim, pode-se sugerir que quanto maior a cadeia do fármaco incorporado na matriz de cimento, maior o valor de resistência obtido, após medição de impedância na solução em contato com essas amostras.

Para o sistema mostrado com contato entre eletrodo de platina e eletrólito, existe um sistema eletroquímico global (SEG) que melhor representa a interação entre espécies e eletrodos relativa a processos interfaciais.

A primeira interação sugerida, leva em consideração a abundância de espécies de PBS dispersas em solução. Partindo dessa premissa, é possível sugerir que esses íons são mais facilmente encontrados adsorvidos na superfície do eletrodo. Logo, tem-se uma primeira interface formada entre eletrodo e solução tampão, chamada de interface 1.

A segunda interface sugerida, chamada de interface 2, é a interface formada entre eletrodo e íons de PBS juntamente com íons de cimento dispersos em solução. A interface 3 é entre o eletrodo e o conjunto PBS, íons de fármaco e íons de cimento que interagem, se aproximando e repelindo de acordo com a carga de cada espécie.

A última das interfaces sugeridas é a interface formada entre a interação das espécies provenientes de fármaco, PBS e cimento. Essa interface se forma próximo à região de adsorção do eletrodo e vai até o interior do eletrólito, sendo limitada pela extinção do gradiente de concentração crescente à medida que se aproxima da superfície do eletrodo.

O perfil de espectro mostrados nos resultados para todas as amostras estudadas representa três semicírculos, que se encontram um pouco sobrepostos entre si. A Figura 34 relaciona o perfil característico dos espectros com os semicírculos que se encontram nesse perfil. O primeiro semicírculo é muito discreto por estar sobreposto ao segundo e também por possuir um valor muito baixo (abaixo de 100Ω), em comparação com os dois que seguem (entre

10^3 a $10^5 \Omega$), como poderá ser observado mais abaixo nos próximos resultados. Os semicírculos estão ligados aos fenômenos que ocorrem durante a aplicação de potencial para realização de medição de impedância e foram observados graças à aplicação de circuitos característicos e verificação da variação da convergência com a variação do circuito buscando a maior convergência na comparação entre esses circuitos.

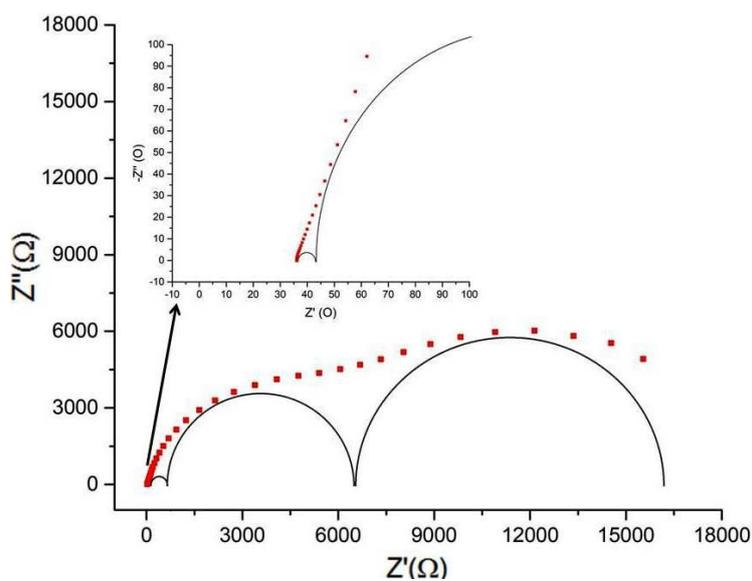


Figura 34 - Espectro característico para o sistema estudado juntamente com os semicírculos que dão origem a esse espectro.

Os fenômenos relacionados à interface eletrodo/eletrólito como transferência de carga, polarização do eletrodo e dupla camada elétrica sofrem influência direta da presença de fármacos em solução. Esses fenômenos são representados, através dos CE's obtidos após realização de *fitting* dos diagramas de Nyquist para cada amostra.

Para este trabalho, os CE's, que representam os fenômenos que ocorrem entre solução e eletrodo, foram obtidos após busca bibliográfica^{68,133-139} e realização de testes com variação dos elementos de circuito e verificação dos efeitos dessas alterações sobre os resultados, tendo em vista a correta representação dos fenômenos que ocorrem na região de interface. Essas mudanças foram realizadas com o intuito de buscar máxima convergência possível desses *fitting's*, com base no estudo dos fenômenos eletroquímicos de eletrólitos líquidos e sólidos em contato com eletrodos.

A Figura 35 apresenta o CE utilizado na realização dos *fitting*'s nos diagramas de Nyquist obtidos das medições de impedância. Este foi o CE que obteve os menores valores de X^2 , depois de realizado o *fitting*, mostrando ser o que melhor representa os fenômenos eletroquímicos na interface entre eletrodo e eletrólito, quando da aplicação de um potencial na solução estudada.

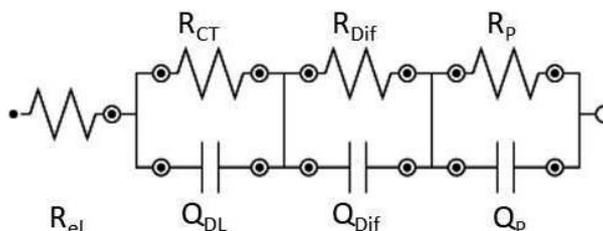


Figura 35 - Circuito equivalente para medições de liberação de fármaco em PBS.

Esse circuito é do tipo $R(RQ)(RQ)(RQ)$, possuindo quatro resistências e três pseudocapacitores. A primeira resistência mostrada é a resistência do eletrólito (R_{el}). Essa resistência é diretamente ligada à distância entre eletrodo de trabalho e contra eletrodo. Quanto mais próximos esses eletrodos estão, menor é o valor dessa resistência.

Os dois elementos que seguem são uma resistência (R_{CT}) em paralelo a uma pseudocapacitância (Q_{DL}). A R_{CT} é atribuída ao fenômeno de transferência de carga do seio da solução até a interface eletrodo/eletrólito, que culmina num comportamento pseudocapacitivo representado pelo elemento de circuito Q_{DL} , que representa o fenômeno de dupla camada elétrica formado devido à atração e adsorção de íons na superfície do eletrodo de platina ^{103,111,134}.

A terceira resistência (R_{Dif}) representa a interação das espécies provenientes da PBS com ela mesma e com as demais espécies que se formam com a adição de CFC e de fármaco ao sistema. Essa interação entre esses íons parece levar a formação uma interface, que resulta nessa resistência e também em um comportamento capacitivo (Q_{Dif}) e é conhecida também como camada difusa ^{111,112}. A conclusão se faz pela observação do efeito da presença desses íons sobre os valores desses elementos de circuito, que será apresentada em detalhes mais a diante no texto.

A quarta resistência, juntamente com o terceiro elemento pseudocapacitivo, são relacionados ao fenômeno de polarização do eletrodo. Esses são os

elementos de circuito que mais se alteram num ambiente com presença de espécies oriundas do SG e do CL, principalmente para os sistemas com presença de SG. O elemento Q_p é relacionado ao acúmulo de íons próximo à superfície do eletrodo, ocorrendo concomitantemente com a dupla camada elétrica, que se forma devido à adsorção de espécies na superfície do eletrodo de platina e à formação da camada difusa logo na fronteira da dupla camada elétrica.

Além do circuito mostrado na Figura 35, os circuitos do tipo $R(RQ)(RQ)$ e do tipo $R([RW]Q)$ foram testados como possíveis CE relacionados aos fenômenos de liberação de fármacos do sistema estudado, porém os valores de X^2 encontrados, após realizado o *fitting*, estavam acima dos valores encontrados para os resultados obtidos com a utilização do circuito $R(RQ)(RQ)(RQ)$. Também foram levadas em consideração, as suposições das interfaces possíveis para o sistema estudado como referência na análise dos possíveis circuitos equivalentes relacionados a esse SEG pra a célula do tipo eletrodo//eletrólito//eletrodo aplicada no presente estudo. Por isso, o circuito equivalente $R(RQ)(RQ)(RQ)$ foi escolhido como circuito que representa os fenômenos de liberação. Na tabela 9 são mostradas médias dos valores de X^2 para as três amostras estudadas. Os valores esperados são os mais próximos de zero, significando uma maior convergência do circuito em comparação com o resultado quanto mais próximo de zero for o valor.

Tabela 9 - Médias dos valores de X^2 para as amostras CFC-C, CFC-G e CFC-L.

Tempo (h)	X^2 CFC-C	X^2 CFC-G	X^2 CFC-L
1	0,0024148	0,0051532	0,0025997
2	0,0019021	0,0041662	0,0018649
3	0,0020463	0,0042089	0,0024261
4	0,0020651	0,0039898	0,0027448
5	0,0020257	0,0042543	0,0026465
6	0,0017565	0,0045651	0,0021631
7	0,0016582	0,0045636	0,0025911
8	0,0016856	0,0040200	0,0017268
24	0,0019756	0,0019559	0,0031561
48	0,0026902	0,0015828	0,0039207
Média	0,0020220	0,0038460	0,0025840

Os mostrados anteriormente na Figura 33 mostram os semicírculos representantes de cada fenômeno muito próximos entre si, possuindo capacitância na mesma ordem de grandeza como poderá ser observado nos resultados mais adiante. Logo, pode-se supor que essas contribuições são quase que simultâneas, por isso os semicírculos são sobrepostos.

A Figura 36 apresenta o modelo proposto para o esquema que representa os fenômenos que ocorrem durante a aplicação de potencial e os elementos de circuito que compõem o CE equivalente, que representa esses fenômenos no estudo de liberação de fármacos de CL. O mesmo esquema se aplica às amostras CFC-C e CFC-G.

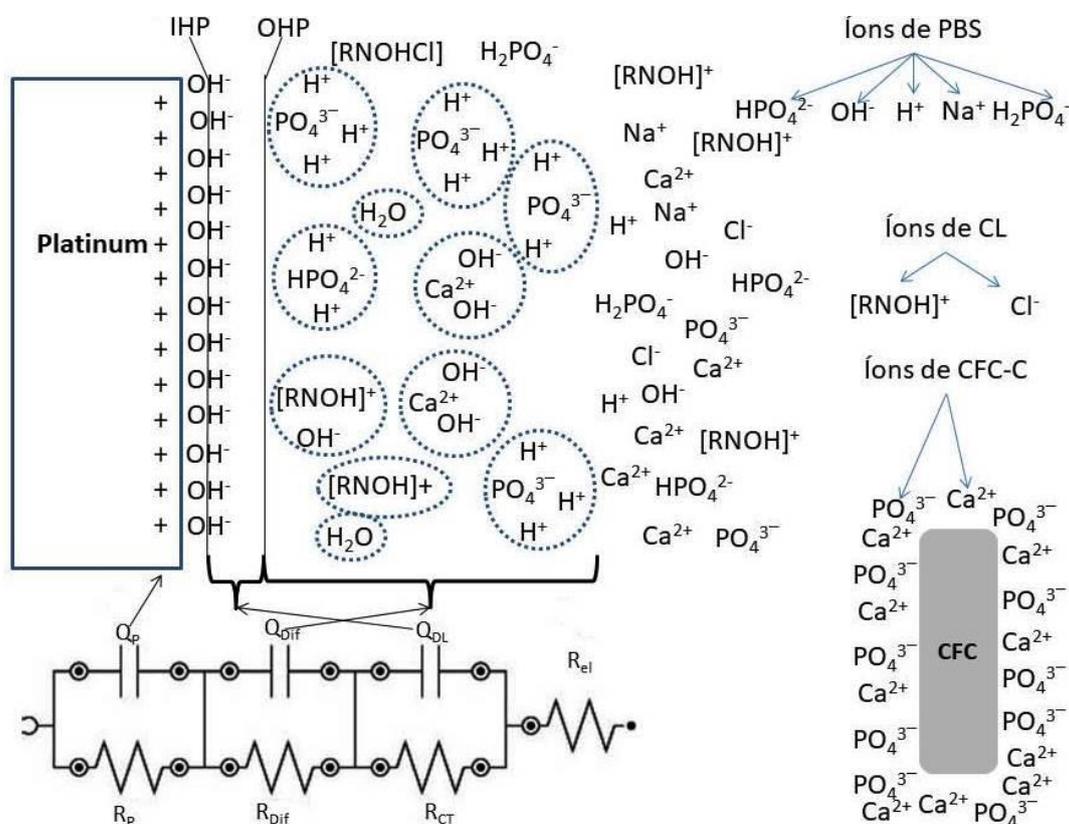


Figura 36 - Esquema de fenômenos durante medição de EIS para amostra CFC-L.

É possível visualizar o IHP, formado pela adsorção de íons e o OHP formados pelo acúmulo de íons próximo à interface do eletrodo, dando origem à camada difusa ^{103,134}. Também é possível visualizar as interações que provocam a resistência à polarização pela dificuldade de acúmulo dos íons próximo à superfície do eletrodo, alterando o processo de polarização.

Os efeitos da presença de íons de CFC e fármacos sobre os fenômenos eletroquímicos e, conseqüentemente, sobre os valores dos elementos de circuito Q_{DL} , Q_{PBS} e Q_P podem ser observados na Figura 37.

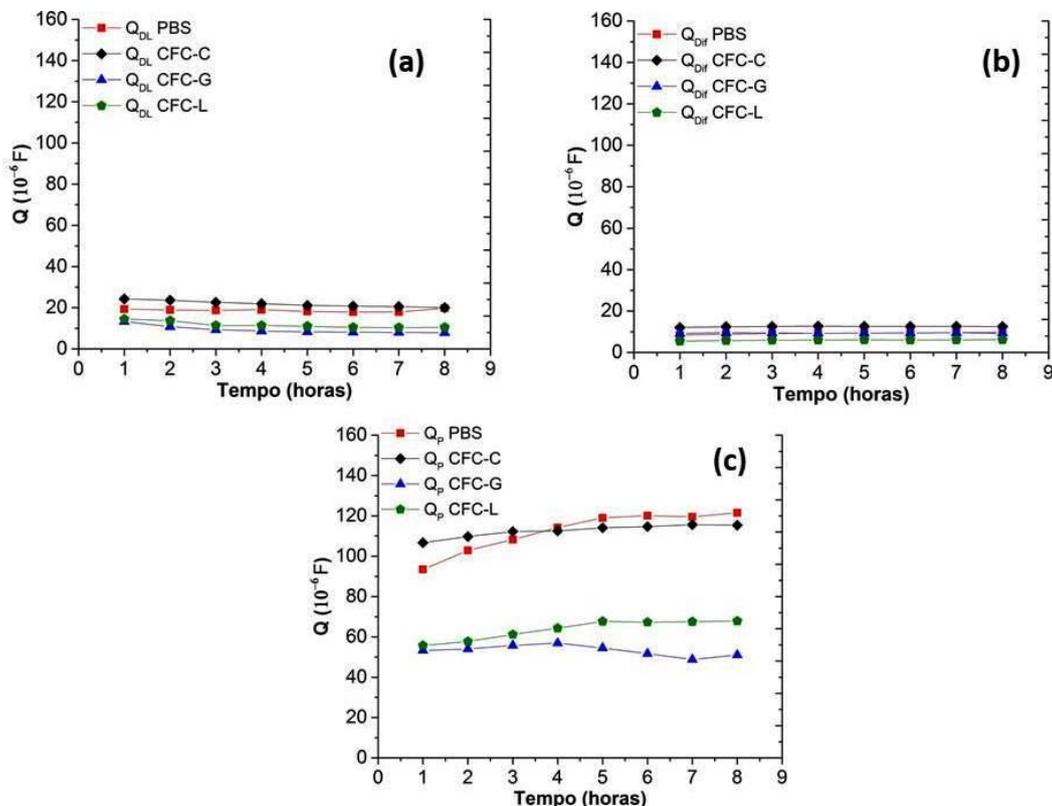


Figura 37 – Capacitância (a) Q_{CT} , (b) Q_{Dif} e (c) Q_P em função do tempo para as amostras PBS, CFC-C, CFC-G e CFC-L.

A presença dos íons de CFC e de fármacos não tem efeitos significativos sobre os valores de Q_{DL} (Fig. 37a) e Q_{Dif} (Fig. 37b). Por outro lado, os íons de SG e CL apresentam efeito expressivo sobre os valores de Q_P (Fig.37c), promovendo uma redução de aproximadamente, 112% para a amostra CFC-G e de 86% para a amostra CFC-L, ambas em comparação com a amostra CFC-C. Esse resultado corrobora para a sugestão de que a presença de fármaco dificulta o fenômeno de polarização do eletrodo por provocar uma redução do comportamento capacitivo que ocorre quando do acúmulo de íons na superfície do eletrodo de platina.

A Figura 38, que mostra os valores de resistência para os circuitos de quatro tipos diferentes de amostras (PBS, CFC-C, CFC-G e CFC-L), representa a influência da presença de espécies na variação dos valores desses elementos com o passar do tempo para as resistências que compõem o CE.

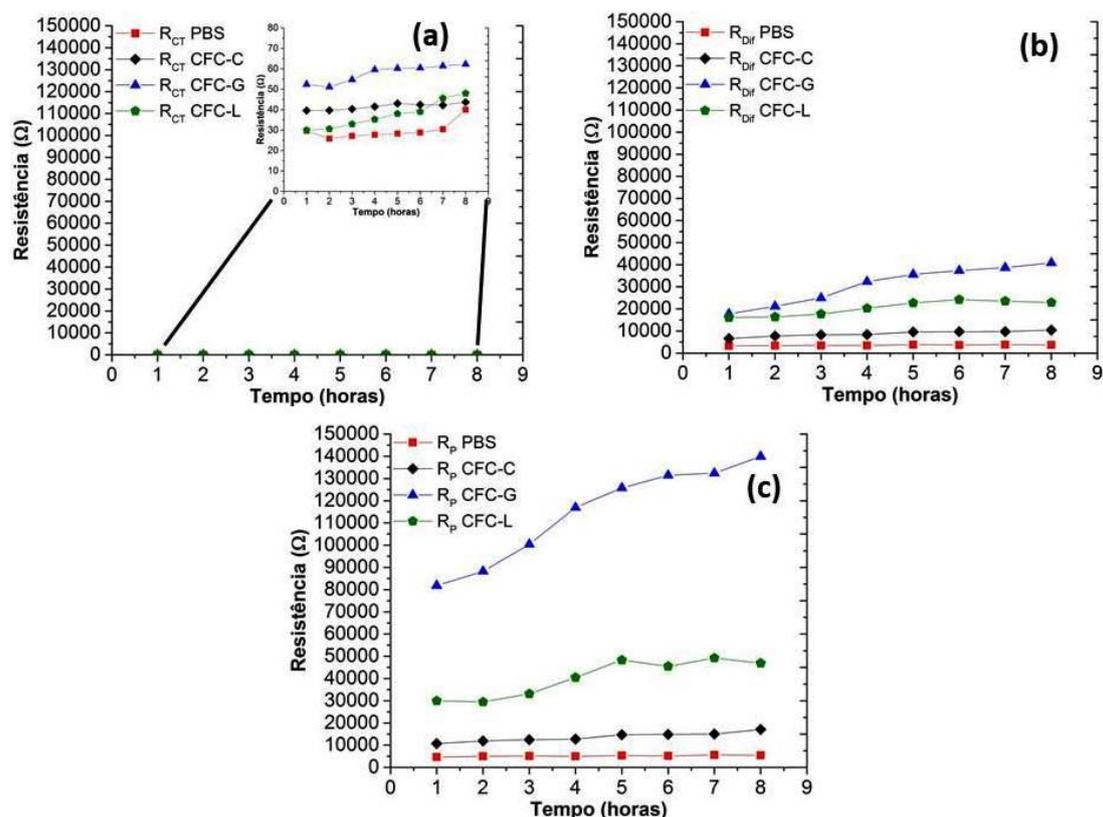


Figura 38 – Efeito do tempo sobre a resistência elétrica em (a) R_{CT} , (b) R_{Dif} e (c) R_P para as amostras PBS, CFC-C, CFC-G e CFC-L.

As amostras com fármaco não mostraram nenhuma variação significativa para os valores de R_{CT} (Fig. 38a). Porém, para as resistências R_{Dif} e R_P ocorreu variação dos valores, com alteração mais significativa para os valores de R_P . Os resultados relacionados à R_{Dif} (Fig. 38b) e R_P (Fig.38c) variaram de acordo com a tabela 10 abaixo.

Tabela 10 - Variação dos valores de R_{Dif} e R_P devido à presença de SG e CL em comparação com a amostra CFC-C.

Amostra	Aumento médio (%)	
	R_{Dif}	R_P
CFC-C	-	-
CFC-G	218,03	632,59
CFC-L	142,72	176,93

Essa variação é em comparação com os valores de resistência para as amostras CFC-C. A adição dos fármacos provoca uma mudança de comportamento nas proximidades do eletrodo. O efeito é mais significativo para a amostra CFC-G, que possui o fármaco com maior comprimento de cadeia. Novamente, a presença desses fármacos parece agir como uma barreira à movimentação das espécies, dificultando seu rearranjo quando da aplicação de

uma diferença de potencial. Esse comportamento desfavorece a aproximação dos íons dispersos em solução da interface eletrodo/eletrólito, de modo que possam promover a polarização do eletrodo e a interação entre íons de próximo à interface eletrodo eletrólito (R_{Dif}).

A influência de cada fármaco foi determinada pelo *fitting* nos diagramas de Nyquist obtidos para observação das alterações em cada elemento de circuito, quando da presença de fármaco em comparação com a solução controle. Dessa forma, foi possível verificar em qual elemento de circuito a presença do fármaco foi mais atuante. Após essa análise observou-se que a resistência à polarização (R_P), quando comparada com as demais resistências que compõem o CE, sofreu maior influência da presença de fármaco em solução. Por isso, esse elemento de circuito foi utilizado como parâmetro de referência no estudo da liberação de fármaco em solução durante o teste *in vitro*.

Tendo esse dado como referência, os perfis de liberação de fármaco, para as amostras CFC-G e CFC-L, foram determinados a partir da correlação entre R_P e concentração de fármacos em solução. Uma curva de calibração foi obtida para cada amostra, para que os valores de R_P em cada tempo de liberação fossem convertidos em quantidade de fármaco liberado em solução no decorrer do teste.

As equações das retas utilizadas para cada tipo de amostra são mostradas na tabela 11 abaixo.

Tabela 11 - Equações e R^2 obtidos das curvas de calibração por EIS para CFC-G e CFC-L.

FÁRMACO	Equação da reta	R^2
Sulfato de Gentamicina	$Y = 0,19067X$	0,95839
Cloridrato de Lidocaína	$Y = 1,8078X - 0,1944$	0,96295

Já na comparação das curvas de calibração, é possível visualizar uma diferença na convergência dos valores. Como se trata de uma técnica em desenvolvimento, melhores ajustes precisam ser feitos para que os valores das medições sejam mais precisos e os valores obtidos nos gráficos apresentem mínima dispersão com um valor de R^2 mais próximo da unidade.

Os valores de R_P obtidos dos *fittings* das amostras CFC-C foram subtraídos dos valores de R_P para CFC-G e CFC-L, assim como ocorre nas análises por

UV-Vis para retirada de ruídos que possam interferir nas medições. A Figura 39 mostra o perfil de liberação para as amostras estudadas.

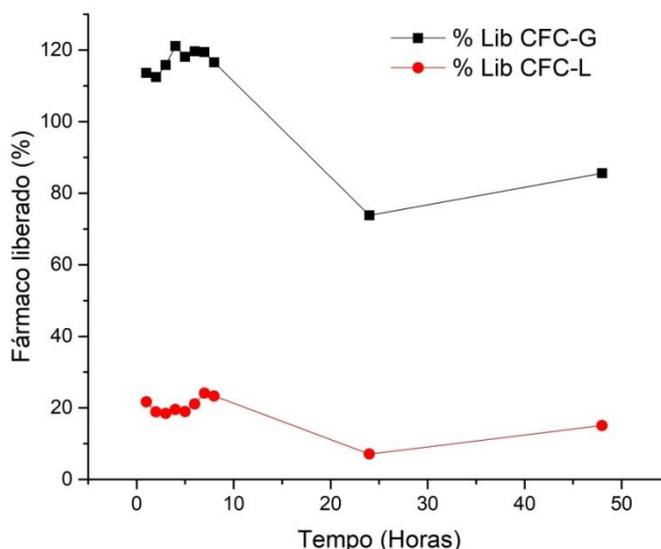


Figura 39 - Perfil de liberação de fármacos por EIS para as amostras CFC-G e CFC-L.

Como pode ser observado, o perfil obtido não está de acordo com os valores encontrados para os resultados das medições por UV-Vis (Fig. 32). Nem mesmo o efeito de acúmulo de íons é observado com o passar do tempo. Essa observação sugere que a subtração dos efeitos do CFC-C não se mostra uma opção adequada para possibilitar a visualização da variação de R_p , relacionada exclusivamente ao efeito da presença do fármaco em solução. A dificuldade de separação dos fenômenos de cada fonte, que compõe o sistema (íons de PBS, de CFC-C e de fármacos), é suportada pelos resultados de UV-Vis para liberação de SG, em que os valores de porcentagem de liberação estão acima de 100%, indicando a possibilidade de interação entre íons do medicamento e demais espécies dispersas em solução.

Porém, quando se considera o acúmulo da quantidade de fármaco liberada em solução, após cada intervalo de tempo (soma cumulativa da quantidade de fármaco liberado após cada hora), o perfil se aproxima do perfil encontrado nos resultados de UV-Vis, com uma aparente redução nos ruídos inerentes à metodologia de medição de liberação de fármacos, convencionalmente utilizada.

Juntamente com essa suposição de soma cumulativa é preciso que fatores de correção sejam aplicados, tanto para a amostra CFC-L quanto para a amostra CFC-G. Os valores aplicados foram de 12 (CFC-L) e de 70 (CFC-G). Eles foram escolhidos baseando-se nas porcentagens de liberação encontradas nos resultados obtidos por UV-Vis. Os fatores de correção foram feitos comparando o perfil de liberação obtido por UV-Vis e por EIS. Quando esses dois perfis são divididos (valores obtidos por EIS divididos por valores obtidos por UV-Vis) os resultados obtidos são 12 para as amostras CFC-L e 70 para as amostras CFC-G. A figura 40 mostra o perfil para as amostras CFC-G (Fig. 40a e Fig. 40b) e CFC-L (Fig. 40c e Fig. 40d).

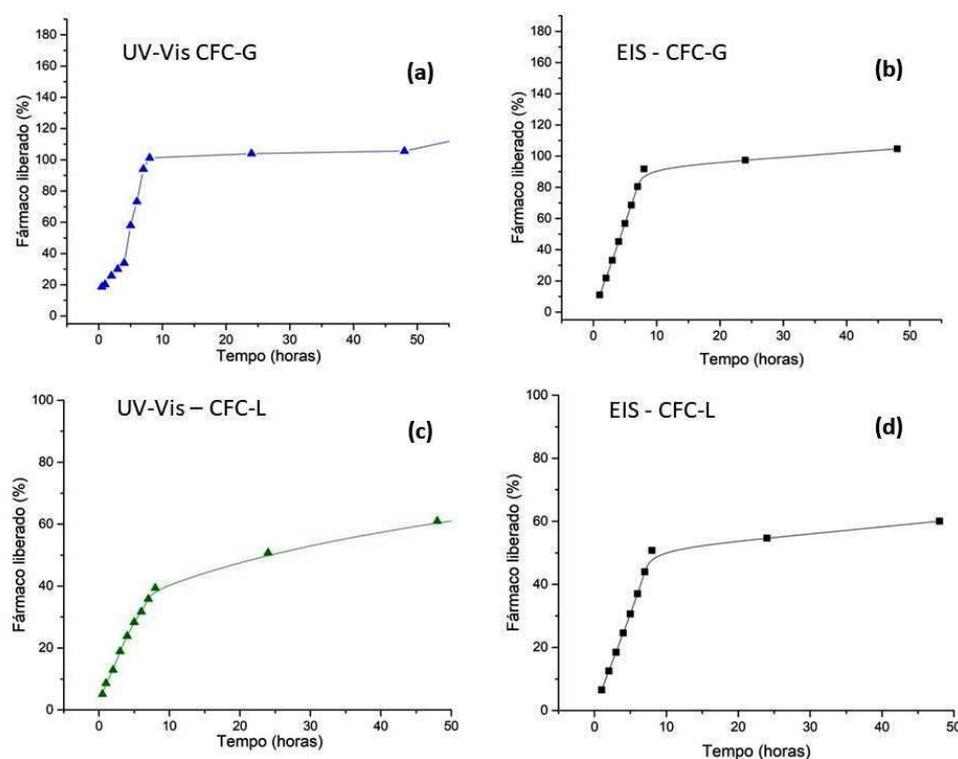


Figura 40 - Perfis de liberação obtidos por (a) e (c) UV-Vis e (b) e (d) EIS.

Os valores dos fatores de correção parecem estar ligados diretamente às propriedades elétricas dos fármacos que, por sua vez, se mostram ligados ao tamanho da cadeia de cada fármaco. Mais estudos precisam ser realizados para confirmar a necessidade de utilização de fatores correção para medições de liberação de fármacos por EIS.

5.4.3 Liberação *In situ* Continuadamente em Potencial de Corrente Contínua

Tendo em vista que a R_p é observada em baixas frequências (aproximadamente 200mV), é possível concluir que as medições, usando um potencial de corrente contínua (com uma fonte e um multímetro) poderiam proporcionar resultados de medições sobre o comportamento da solução na ocorrência de um gradiente de concentração de fármaco, assim como ocorre nas medições por EIS. A conclusão se valida baseando-se no fato de que os valores de frequência por volta de 10^{-1} Hz para esse fenômeno se aproximam de um comportamento com resposta de corrente relacionada à aplicação de potencial de corrente contínua onde a frequência é nula ^{103,140}.

Medições com uma fonte foram realizadas a título de comparação. Vale lembrar que um estudo mais criterioso com padronização do método de medições, como ocorreu com os trabalhos utilizando a EIS, é necessário para confirmar a resposta de resistência para uma amostra durante uma medição em corrente contínua. A Figura 41 mostra a comparação entre as resistências para medições em corrente contínua (utilizando fonte e multímetro) e de corrente alternada (utilizando o potenciostato). Os valores de resistência para as medições por EIS são para resistência total (R_T) e para as medições em corrente contínua tem-se os valores de resistência pura (R_{DC}). O potencial utilizado nessa medição foi de 1,1V.

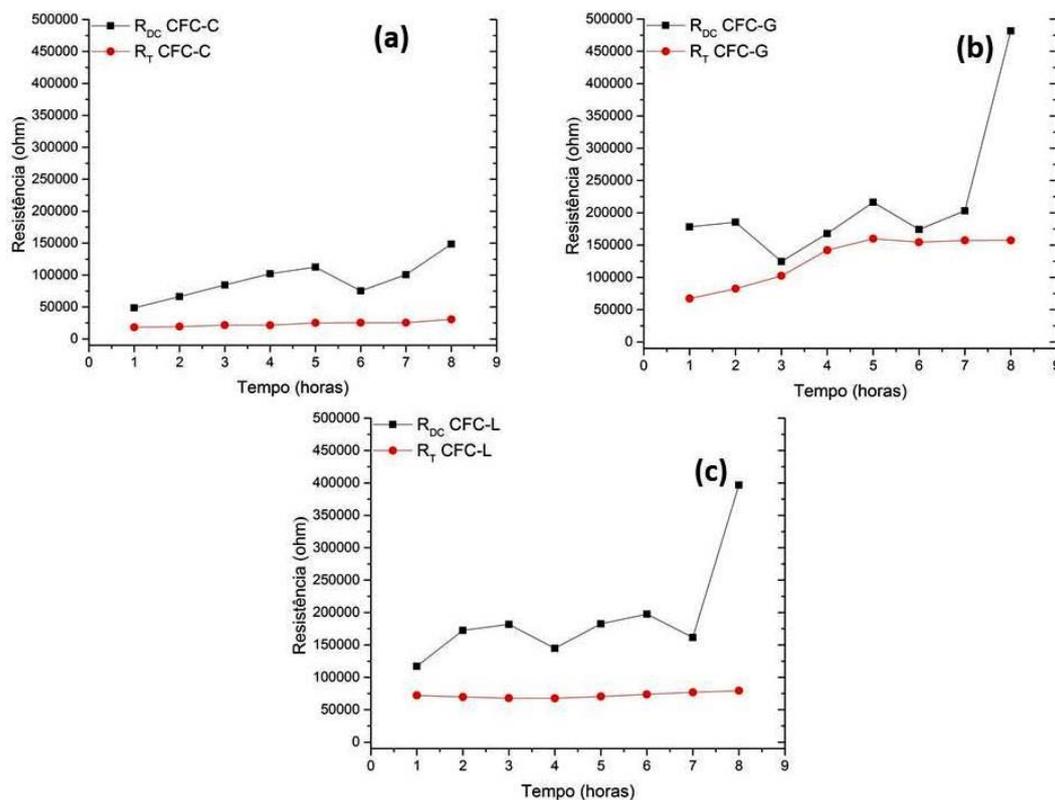


Figura 41 - Resistência para medições em corrente contínua e corrente alternada para (a) CFC-C, (b) CFC-G e (c) CFC-L

Utilizar uma fonte de potencial de corrente contínua não possibilita medições com respostas detalhadas e de alta sensibilidade, como nas medições com um potenciostato, porém pode ser um método simples para determinar aproximações de concentrações durante um teste de liberação de fármacos *in vitro* e mostram uma maior influência sobre a resistência à polarização dos eletrodos para o caso de aplicação de potencial somente em corrente contínua.

6. CONCLUSÕES

As medições de espectroscopia de impedância eletroquímica *in situ* continuamente se mostraram uma ferramenta de alta eficiência na determinação dos fenômenos eletroquímicos, influenciados pela variação da concentração de íons de fármacos em solução. Esse resultado possibilita sua utilização como técnica para determinação da quantidade de fármaco liberado em solução durante o teste. Porém, é necessário um refino na metodologia para que os valores obtidos sejam também adequados, não só no perfil de liberação obtido, como também na grandeza dos resultados encontrados com essa técnica.

O estudo detalhado dos fenômenos ligados ao contato entre eletrodo e solução possibilitou visão mais criteriosa sobre a relação entre resistência da solução e variação do gradiente de concentração na interface eletrodo/eletrólito.

Uma célula eletroquímica foi desenvolvida para o acompanhamento de testes de liberação de fármacos e proporcionou a determinação da correlação entre liberação de fármacos (variação do gradiente de concentração em meio aquoso) e alteração no comportamento eletroquímico do sistema com o passar do tempo *in situ*.

A padronização da medição de impedância, durante o teste com determinação de potencial DC, amplitude, influência de agitação magnética, influência de injeção de gás inerte (N₂) e presença de espécies variadas proporcionou melhor entendimento da relação desses parâmetros com os fenômenos inerentes ao teste, possibilitando escolhas dos parâmetros mais adequados para medições de liberação de fármaco em solução tampão fosfato pH 7,4.

Foi observada uma relação direta entre presença de fármacos em solução e valores dos elementos de circuito encontrados após realização de *fitting*. A resistência à polarização foi o elemento de circuito que mais sofreu influência com a presença de fármaco em solução, se mostrando um parâmetro importante na correlação entre gradiente de concentração de fármaco em solução e alteração no comportamento elétrico do meio líquido.

Os resultados por EIS mostraram uma relação de maior complexidade de interação entre as espécies dispersas em meio aquoso. Isso limitou a determinação da porcentagem de fármacos liberado em solução com o passar do tempo, que foi obtida com utilização de fatores de correção e suposição de um comportamento cumulativo durante os cálculos das porcentagens de fármaco liberado, mesmo sendo em um ambiente com liberação de fármaco continuada, ou seja, sem retirada de amostras entre cada intervalo de tempo.

A técnica de EIS tem como vantagem, em comparação com a técnica de UV-Vis e também com a medição em corrente contínua, a sensibilidade do equipamento que proporciona mais precisão na determinação do perfil de liberação. Porém, é necessária uma boa compreensão dos fenômenos eletroquímicos que envolvem o processo de liberação, em ambiente com aplicação de diferença de potencial como ocorre durante as medições de impedância. Esse conhecimento não é obrigatório no caso da técnica de UV-Vis.

Uma das maiores vantagens na utilização de EIS, para medidas de liberação de fármacos, é a possibilidade de realizar as medições durante o teste de liberação, ensaio que não pode ser realizado com a técnica de UV-Vis.

A principal desvantagem para medição por EIS atualmente é a necessidade de melhor conhecimento das interações entre as espécies dispersas em solução, para melhor separação da contribuição de cada espécie presente no meio, e assim obter a contribuição exclusivamente do fármaco estudado e, talvez, eliminar a necessidade de correção dos valores obtidos com a utilização de fatores de correção.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Obter novas curvas de calibração para as medições de liberação de fármacos por EIS para verificar reprodutividade dos comportamentos para outros tipos de medicamentos;
- Estudar a interação entre fármacos, cimento de fosfato de cálcio e solução tampão fosfato pH 7,4;
- Realizar medições de liberação com outros tipos de fármacos para complementar informações sobre correlação tamanho de cadeia com resistência á polarização;
- Fabricar tampa de célula com melhor vedação para eliminar a necessidade de agitação magnética e injeção de gás inerte;
- Fabricar célula com dimensões reduzidas para utilização de fármacos em quantidades menores que 1mL;
- Realizar estudo de comparação entre medições em potencial de corrente contínua e potencial de corrente alternada;
- Estudo detalhado da interação dos íons dispersos no meio e superfície do eletrodo para melhor compreensão da contribuição da cada espécie, levando em consideração efeitos cinéticos e eletroquímicos;
- Escolher mais modelos matemáticos que expliquem os fenômenos pelos quais a liberação ocorre.

8. REFERÊNCIAS

1. Mathers, C. D., Stevens, G. A., Boerma, T., White, R. A. & Tobias, M. I. Causes of international increases in older age life expectancy. *Lancet* **385**, 540–548 (2015).
2. Dorozhkin, S. V., Liu, C., He, H. & Dorozhkin, S. V. *Developments and Applications of Calcium Phosphate Bone Cements*. **9**, (Springer Singapore, 2018).
3. Ginebra, M. P., Canal, C., Espanol, M., Pastorino, D. & Montufar, E. B. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1090–1110 (2012).
4. Habraken, W., Habibovic, P., Epple, M. & Bohner, M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Mater. Today* **19**, 69–87 (2016).
5. Zhang, J., Liu, W., Schnitzler, V., Tancret, F. & Bouler, J. M. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater.* **10**, 1035–1049 (2014).
6. Santos, L. A. Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para uso na Área Médico-Odontológica. 274 (2002).
7. Colpo, J. C. C. Cimentos Ósseos Alfa-Fosfato Tricálcico E Alfa Fosfato Tricálcico De Dupla Pega: Desenvolvimento/Caracterização Para Fins De Liberação Controlada De Fármacos E Vigilância Sanitária. (UFRGS, 2017).
8. Vásquez, A. F. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CIMENTOS MACROPOROSOS DE alfa-TCP PELO MÉTODO DE ESPUMAÇÃO DIRETA MANUAL. 117 (2016).
9. Aragón, J. *et al.* In vitro release kinetics and physical, chemical and mechanical characterization of a POVIAC®/CaCO₃/HAP-200 composite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **23**, 259–270 (2012).
10. Lanzillotti, P. F. Sistema para liberação modificada de fármacos. 117 (2012).
11. Wadhwa, R., Lagenaur, C. F. & Cui, X. T. Electrochemically controlled

- release of dexamethasone from conducting polymer polypyrrole coated electrode. *J. Control. Release* **110**, 531–541 (2006).
12. Lopes, C. M. *et al.* Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **41**, 143–154 (2005).
 13. Evans, K., Amenhotep, Z., Dawson, D., Waters, H. & Ardern, J. Hematology. in *The Immunoassay Handbook* 795–815 (Elsevier Ltd, 2013). doi:10.1016/B978-0-08-097037-0.00065-8
 14. Ginebra, M. P., Traykova, T. & Planell, J. A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *J. Control. Release* **113**, 102–110 (2006).
 15. Sun, W. *et al.* Biodegradable Drug-Loaded Hydroxyapatite Nanotherapeutic Agent for Targeted Drug Release in Tumors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 7832–7840 (2018).
 16. Son, J. S. *et al.* Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres. *J. Control. Release* **153**, 133–140 (2011).
 17. Rasyid, H. N. *et al.* Concepts for increasing gentamicin release from handmade bone cement beads. *Acta Orthop.* **80**, 508–513 (2009).
 18. Su, W. Y., Chen, Y. C. & Lin, F. H. A new type of biphasic calcium phosphate cement as a gentamicin carrier for osteomyelitis. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, (2013).
 19. Yu, T., Ye, J., Gao, C., Yu, L. & Wang, Y. Synthesis and drug delivery property of calcium phosphate cement with special crystal morphology. *J. Am. Ceram. Soc.* **93**, 1241–1244 (2010).
 20. De Diego, M., Godoy, G. & Mennickent, S. Chemical stability of ceftriaxone by a validated stability-indicating liquid chromatographic method. *J. Chil. Chem. Soc.* **55**, 335–337 (2010).
 21. Xu, X., Lu, P., Guo, M. & Fang, M. Cross-linked gelatin/nanoparticles composite coating on micro-arc oxidation film for corrosion and drug release. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 2367–2371 (2010).
 22. Goyanes, A., Buanz, A. B. M., Hatton, G. B., Gaisford, S. & Basit, A. W. 3D printing of modified-release aminosalicylate (4-ASA and 5-ASA)

- tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **89**, 157–162 (2014).
23. Anagnostakos, K., Wilmes, P., Schmitt, E. & Kelm, J. Elution of gentamicin and vancomycin from polymethylmethacrylate beads and hip spacers in vivo. *Acta Orthop.* **80**, 193–197 (2009).
 24. Frutos, P., Diez-Peña, E., Frutos, G. & Barrales-Rienda, J. M. Release of gentamicin sulphate from a modified commercial bone cement. Effect of (2-hydroxyethyl methacrylate) comonomer and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) additive on release mechanism and kinetics. *Biomaterials* **23**, 3787–3797 (2002).
 25. Colpo, J. C., Pigatto, C., Brizuela, N., Aragón, J. & dos Santos, L. A. L. Antibiotic and anesthetic drug release from double-setting α -TCP cements. *J. Mater. Sci.* (2018). doi:10.1007/s10853-018-2071-4
 26. Siepmann, J. & Siepmann, F. *Mathematical modeling of drug delivery. International Journal of Pharmaceutics* **364**, 328–343 (2008).
 27. Arredondo, B. *et al.* Monitoring degradation mechanisms in PTB7:PC71BM photovoltaic cells by means of impedance spectroscopy. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **144**, 422–428 (2016).
 28. Colpo, J. C., Pigatto, C., Ingrassia, A., Coelho, W. T. & Santos, L. A. CIMENTO ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO ADICIONADO DE FÁRMACOS: CARACTERIZAÇÃO PARA FINS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA. (2015).
 29. Park, J. B. & Fung, Y. C. Biomaterials, an Introduction. *J. Biomech. Eng.* **102**, 161 (1980).
 30. Galletti, P. M. & Boretos, J. W. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on the Clinical Applications of Biomaterials. November 1-3, 1982. *Artif. Organs* **17**, 539–555 (1983).
 31. Putter, C. de. *Implant materials in biofunction: proceedings of the Seventh European Conference on Biomaterials, Amsterdam, the Netherlands, September 8-11, 1987.* (Elsevier, 1988).
 32. Williams, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **30**, 5897–5909 (2009).
 33. Jaganathan, S. K., Supriyanto, E., Murugesan, S., Balaji, A. & Asokan, M.

- K. Biomaterials in Cardiovascular Research: Applications and Clinical Implications. *Biomed Res. Int.* **2014**, 11 (2014).
34. Pires, A. L. R., Bierhalz, A. C. K. & Moraes, Â. M. Biomaterials: Types, Applications, and Market. *Quim. Nova* **38**, 957–971 (2015).
 35. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Manual de registro e cadastramento de materiais de uso em saúde. 306 (2011). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 36. Volkmer, T. M. Obtenção E Caracterização De Hidroxiapatita Porosa Pelo Método Gelcasting De Espumas Para Uso Como Implantes. *Chem. ...* 139 (2004).
 37. Fernandes, J. M. Síntese e caracterização de cimento de α -fosfato tricálcico reforçado com hidrogel de Alginato de Sódio e PVA para aplicação médico-odontológica. 169 (2013).
 38. Habibovic, P. & Groot, K. de. Osteoinductive biomaterials – properties and relevance in bone repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **1**, 25–32 (2007).
 39. Saini, M. Implant biomaterials: A comprehensive review. *World J. Clin. Cases* **3**, 52 (2015).
 40. Patel, N. & Gohil, P. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. *Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng.* **2**, 91–101 (2012).
 41. Okamoto, T., RANGEL-GARCIA JÚNIOR, I., Magro-filho, O. & de Castro STORTI, S. IMPLANTE DE OSSO ANORGÂNICO EM CAVIDADE ÓSSEA: ESTUDO HISTOLÓGICO EM RATOS.
 42. Refojo, M. F. *Application of Materials in Medicine and Dentistry: Ophthalmologic Applications. Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine* (1996). doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00148-0
 43. Sidambe, A. T. Biocompatibility of advanced manufactured titanium implants-A review. *Materials (Basel)*. **7**, 8168–8188 (2014).
 44. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **55**, 272–326 (2015).

45. Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 1487–1510 (1991).
46. Parent, M., Baradari, H., Champion, E., Damia, C. & Viana-Trecant, M. Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance. *J. Control. Release* **252**, 1–17 (2017).
47. Tomio SANADA José Gustavo Ribeiro RODRIGUES, J., Calicchio CANOVA, G., Mary CESTARI, T., Mikio TAGA Rumio TAGA, E. & Afonso Rabelo BUZALAF José Mauro GRANJEIRO, M. ANÁLISE HISTOLÓGICA, RADIOGRÁFICA E DO PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS APÓS IMPLANTAÇÃO DE ENXERTO DE OSSO ESPONJOSO BOVINO DESMINERALIZADO EM BLOCO EM MÚSCULO DE RATOS HISTOLOGIC, RADIOGRAPHIC AND IMUNOGLOBULINE PROFILE ANALYSIS AFTER IMPLANTATION BLOCKS OF DEMINERALIZED BOVINE CANCELLOUS BONE GRAFT IN MUSCLE OF RATS.
48. Carvalho, V. A. P., Tosello, D. de O., Salgado, M. A. de C. & Gomes, M. F. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **19**, 679–686 (2004).
49. Park, J. B. *Biomaterials An Introduction*. (Corporation, Plenum Publishing, 1979).
50. Dorozhkin, S. V. Les orthophosphates de calcium (CaPO₄): occurrence et propriétés. *Morphologie* **101**, 125–142 (2017).
51. Verron, E., Khairoun, I., Guicheux, J. & Bouler, J.-M. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. *Drug Discov. Today* **15**, 547–552 (2010).
52. Roemhildt, M. L. Calcium phosphate compatible bone cement: characterization, bonding properties and tissue response. (2002).
53. Tang, Z., Li, X., Tan, Y., Fan, H. & Zhang, X. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Regen.*

- Biomater.* **5**, 43–59 (2018).
54. Hench, L. L. Biomaterials: A forecast for the future. *Biomaterials* **19**, 1419–1423 (1998).
 55. Leó, B. & Jansen, J. A. *Thin calcium phosphate coatings for medical implants. Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants* (2009). doi:10.1007/978-0-387-77718-4
 56. Bimis, A., Canal, L. P., Karalekas, D. & Botsis, J. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials On the mechanical characteristics of a self-setting calcium phosphate cement. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **68**, 296–302 (2017).
 57. Safronova, T. V., Putlyaev, V. I., Avramenko, O. A., Shekhirev, M. A. & Veresov, A. G. Ca-deficient hydroxyapatite powder for producing tricalcium phosphate based ceramics. *Glas. Ceram. (English Transl. Steklo i Keramika)* **68**, 28–32 (2011).
 58. Rodrigues, P. L., Almeida, F. S. de, Motisuke, M. & Sousa, E. de. Efeito da adição de alumina nas propriedades físicas e mecânicas do β -fosfato tricálcico. *Cerâmica* **58**, 368–373 (2012).
 59. Carrodegua, R. G. & De Aza, S. α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* **7**, 3536–3546 (2011).
 60. Driessens, F. C. M., Boltong, M. G., Bermudez, O. & Planell, J. A. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: A pilot study. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **4**, 503–508 (1993).
 61. Ginebra, M. P., Traykova, T. & Planell, J. A. Calcium phosphate cements: Competitive drug carriers for the musculoskeletal system? *Biomaterials* **27**, 2171–2177 (2006).
 62. Bimis, A., Canal, L. P., Karalekas, D. & Botsis, J. On the mechanical characteristics of a self-setting calcium phosphate cement. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **68**, 296–302 (2017).
 63. O’Neill, R. *et al.* Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. *Acta Biomater.* **50**, 1–19 (2017).
 64. Lobo, S. E. & Arinzeh, T. L. Biphasic calcium phosphate ceramics for

- bone regeneration and tissue engineering applications. *Materials (Basel)*. **3**, 815–826 (2010).
65. Monma, H. & Kanazawa, T. The hydration of α -tricalcium phosphate. *Yogyo-Kyokai-Shi* **84**, 209–213 (1976).
 66. Tibbitt, M. W., Dahlman, J. E. & Langer, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. (2016). doi:10.1021/jacs.5b09974
 67. Loca, D., Sokolova, M., Locs, J., Smirnova, A. & Irbe, Z. Calcium phosphate bone cements for local vancomycin delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **49**, 106–113 (2015).
 68. Colpo, J. C. J. C. *et al.* Electrochemical impedance spectroscopy: Evaluation of drug delivery system of alpha-tricalcium phosphate cement. *Mater. Sci. Forum* **820**, 23–27 (2015).
 69. Schnieders, J., Gbureck, U., Thull, R. & Kissel, T. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement. *Biomaterials* **27**, 4239–4249 (2006).
 70. Uchino, M. *et al.* Elution Characteristics of Vancomycin, Gentamicin, and Vancomycin/Gentamicin Combination from Calcium Phosphate Cement. *Adv. Orthop. Surg.* **32**, 5 (2016).
 71. Stallmann, H. P., Faber, C., Bronckers, A. L. J. J., Amerongen, A. V. N. & Wuisman, P. I. J. M. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile. *BMC Musculoskelet. Disord.* **7**, 1–8 (2006).
 72. Torrado, S., Frutos, P. & Frutos, G. Gentamicin bone cements: Characterisation and release (in vitro and in vivo assays). *Int. J. Pharm.* **217**, 57–69 (2001).
 73. Daculsi, G. U. Y., Laboux, O., Malard, O. & Weiss, P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**, 195–200 (Kluwer Academic Publishers, 2003).
 74. Mäkinen, T. J. *et al.* In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from osteoconductive bone defect filler. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 1063–1068 (2005).

75. Allen, L. V, Popovich, N. G. & Ansel, H. C. *Ansel's Pharmaceutical Dosage Form and Drug Delivery Systems*. (2011).
76. David E. Golan, Armstrong, E. J. & Armstrong, A. W. *Principles of Pharmacology - The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. (Wolters Kluwer, 2017). doi:10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C
77. Van De Belt, H. *et al.* Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials* **21**, 1981–1987 (2000).
78. Routledge, P. A. *Therapeutic Drug Monitoring (TDM). The Immunoassay Handbook* (Elsevier Ltd, 2007). doi:10.1016/B978-0-08-097037-0.00065-8
79. Gentamicin sulphate | C₆₀H₁₂₅N₁₅O₂₅S - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6419933#section=Top>. (Accessed: 21st June 2018)
80. Clarot, I., Chaimbault, P., Hasdenteufel, F., Netter, P. & Nicolas, A. Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. **1031**, 281–287 (2004).
81. Hayward, C. R. S. *et al.* SYSTEMATIC REVIEW AND META - ANALYSIS Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults : a systematic review. 223–238 (2018). doi:10.1111/bcp.13439
82. Pishbin, F. *et al.* Electrophoretic Deposition of Gentamicin-Loaded Bioactive Glass / Chitosan Composite Coatings for Orthopaedic Implants. (2014). doi:10.1021/am5014166
83. Weinstein, M. J. *et al.* Gentamicin, a New Antibiotic Complex from Micromonospora. *J. Med. Chem.* **6**, 463–464 (1963).
84. Rosenkrantz, B. E., Greco, J. R., Hoogerheide, J. G. & Oden, E. M. Gentamicin Sulfate. in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* **9**, 295–340 (1981).
85. Iwakura, T. *et al.* Gentamycin-impregnated calcium phosphate cement for calcaneal osteomyelitis: A case report. *J. Orthop. Surg.* **22**, 437–439 (2014).

86. SAÚDE, M. DA. *Formulário Terapêutico Nacional - RENAME 2010*. (Editora MS, 2010).
87. Schulman, J. M. & Strichartz, G. R. Farmacologia dos anestésicos locais. in *Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Terapia Medicamentosa* (eds. Golan, D. E., Amrmstong, E. J. & Armstrong, A. W.) 1–15 (Wolters Kluwer, 2017).
88. Edgcombe, H., Hocking, G. & Hospital, J. R. Local Anaesthetic Pharmacology. *World Anaesth. Tutor. Week 1–7* (2005).
89. Lidocaine hydrochloride | C14H23ClN2O - PubChem. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6314>. (Accessed: 21st June 2018)
90. Araújo, D. R. de, Pinto, L. de M. A., Braga, A. de F. de A. & Paula, E. de. Formulações de Anestésicos Locais de Liberação Controlada : **53**, 663–671 (2003).
91. Palazzo, B. *et al.* Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 2180–2188 (2007).
92. Yu, D. *et al.* Self-setting hydroxyapatite cement: A novel skeletal drug-delivery system for antibiotics. *J. Pharm. Sci.* **81**, 529–531 (1992).
93. Perkampus, H.-H. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992). doi:10.1007/978-3-642-77477-5 e-ISBN-13:
94. Callum Alexander, J. *Surface Modifications and Growth of Titanium Dioxide for Photo-Electrochemical Water Splitting*.
95. Chen, Z., Dinh, H. N. & Miller, E. *Photoelectrochemical Water Splitting Standards , Experimental Methods , and Protocols*. (Springer, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-8298-7
96. SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J. & GLAJCH, J. L. *PRACTICAL HPLC METHOD DEVELOPMENT PRACTICAL HPLC METHOD Second Edition*. (JOHN WILEY & SONS, INC., 1997).
97. Thammana, M. A Review on High Performance Liquid Chromatography (

- HPLC). **5**, 22–28 (2016).
98. Ferreira, J. Z. Notas de Aula HPLC. 58 (2015).
 99. Argenton, A. *Conceitos fundamentais de Alto Desempenho (HPLC)*. (2010).
 100. Smith, D. S. & Eremin, S. A. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 1499–1507 (2008).
 101. Lippolis, V. & Maragos, C. Fluorescence polarisation immunoassays for rapid, accurate and sensitive determination of mycotoxins. *World Mycotoxin J.* **7**, 479–490 (2014).
 102. Slagle, K. M. & Ghosn, S. J. Immunoassays: Tools for sensitive, specific, and accurate test results. *Lab. Med.* **27**, 177–183 (1996).
 103. Barsoukov, E. and J. R. M. *Impedance Spectroscopy - Theory, Experiment, and Applications*. (Wiley, 2018).
 104. Chinaglia, D. L., Gozzi, G., Alfaro, R. A. M. & Hessel, R. Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino. *Rev. Bras. Ensino Física* **30**, 4504 (2008).
 105. Carvalho, L. A. de, Andrade, A. R. de & Bueno, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. *Quim. Nova* **29**, 796–804 (2006).
 106. Badwal, S. P. S., Giddey, S., Kulkarni, A., Goel, J. & Basu, S. Direct ethanol fuel cells for transport and stationary applications – A comprehensive review. *Appl. Energy* **145**, 80–103 (2015).
 107. King, A. D., Birbilis, N. & Scully, J. R. Accurate Electrochemical Measurement of Magnesium Corrosion Rates; a Combined Impedance, Mass-Loss and Hydrogen Collection Study. *Electrochim. Acta* **121**, 394–406 (2014).
 108. Rodolfo, A. & Santos, D. O. S. Análise por Impedância Eletroquímica ‘Online’ de Conjuntos Eletrodo/Membrana (MEA) de Células a Combustíveis a Membrana Polimérica. (USP, 2007).
 109. Kissinger, P. T. & Heineman, W. R. Cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.*

- 60**, 702 (1983).
110. Pasqual, J. A. R. *et al.* Análise da interação entre cimento de fosfato de cálcio e cloridrato de lidocaína através de espectroscopia de impedância eletroquímica. in *COLAOB 2018* 10 (2018).
 111. Ticianelli, E. A. & Gonzalez, E. R. *Eletroquímica : princípios e aplicações*. (EDUSP, 2005).
 112. Brett, C. M. A. & Brett, A. M. O. *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. (Oxford University Press Oxford, 1993).
 113. Aleixo, L. M. Voltametria : Conceitos E Técnicas. *Chemkeys* 1–40 (2003).
 114. Kissinger, P. T., Lafayette, W. & Heineman, W. R. Cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.* 702–706 doi:10.1021/ed060p702
 115. Rountree, E. S., Mccarthy, B. D., Eisenhart, T. T. & Dempsey, J. L. Evaluation of homogeneous electrocatalysts by cyclic voltammetry. *Inorg. Chem.* **53**, 9983–10002 (2014).
 116. Elgrishi, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **95**, 197–206 (2018).
 117. UFMG. Protocolos Soluções do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular. Available at: <http://labs.icb.ufmg.br/lbem/protocolos/SOLUCAO.html>. (Accessed: 13th December 2018)
 118. BOHNER, M. *et al.* Gentamicin-Loaded Hydraulic Calcium Phosphate Bone Cement as Antibiotic Delivery System. *J. Pharm. Sci.* **86**, 565–572 (1997).
 119. Koderá, F., Kuwahara, Y., Nakazawa, A. & Umeda, M. Electrochemical corrosion of platinum electrode in concentrated sulfuric acid. *J. Power Sources* **172**, 698–703 (2007).
 120. ASTM. Standard Test Methods for Apparent Porosity , Water Absorption , Apparent Specific Gravity , and Bulk Density of Burned Refractory Brick and Shapes by Boiling Water. *Astm C20-00* **0**, 1–3 (2015).
 121. Winter, R. F. Half-Wave Potential Splittings $\Delta E_{1/2}$ as a Measure of Electronic Coupling in Mixed-Valent Systems: Triumphs and Defeats.

- (2014). doi:10.1021/om500029x
122. Sheng, W. *et al.* Correlating hydrogen oxidation and evolution activity on platinum at different pH with measured hydrogen binding energy. *Nat. Commun.* **6**, 5848 (2015).
 123. Scully, J. R. Characterization of the Corrosion of Aluminum Thin Films Using Electrochemical Impedance Methods. *ASTM* 276–296 (1993).
 124. Gallinetti, S., Canal, C. & Ginebra, M.-P. Development and Characterization of Biphasic Hydroxyapatite/ b-TCP Cements. doi:10.1111/jace.12861
 125. Trombetta, R., Inzana, J. A., Schwarz, E. M., Kates, S. L. & Awad, H. A. 3D Printing of Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery. *Ann. Biomed. Eng.* **45**, 23–44 (2017).
 126. Diez-Escudero, A., Espanol, M., Beats, S. & Ginebra, M. P. In vitro degradation of calcium phosphates: Effect of multiscale porosity, textural properties and composition. *Acta Biomater.* **60**, 81–92 (2017).
 127. Macdonald, M. A. & Andreas, H. A. Method for equivalent circuit determination for electrochemical impedance spectroscopy data of protein adsorption on solid surfaces. *Electrochim. Acta* **129**, 290–299 (2014).
 128. Randviir, E. P. & Banks, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: An overview of bioanalytical applications. *Anal. Methods* **5**, 1098–1115 (2013).
 129. Wang, S., Xing, Y., Xiao, C., Xu, H. & Zhang, S. A peapod-inspired MnO@C core-shell design for lithium ion batteries. *J. Power Sources* **307**, 11–16 (2016).
 130. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition.* Thompson Brooks/Cole (1998). doi:10.1016/S0003-2670(00)84936-3
 131. Ministério da Saúde -MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. RESOLUÇÃO – RE N° 899, DE 29 DE MAIO DE 2003. *Diário Of. da União* (2003).
 132. Siepmann, J., Siegel, R. A. & Rathbone, M. J. *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery.* *Journal of Chemical*

- Information and Modeling* **53**, (2013).
133. Alves, V. ., da Silva, L. . & Boodts, J. F. . Surface Characterisation of IrO₂/TiO₂/CeO₂ Oxide Electrodes and Faradaic Impedance Investigation of the Oxygen Evolution Reaction From Alkaline Solution. *Electrochim. Acta* **44**, 1525–1534 (1998).
 134. Chang, B.-Y. & Park, S.-M. Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **3**, 207–229 (2010).
 135. Grieten, L. *et al.* Real-time study of protein adsorption on thin nanocrystalline diamond. *Phys. Status Solidi* **208**, 2093–2098 (2011).
 136. Lassali, T. A. F., Boodts, J. F. C. & Bulhões, L. O. S. Charging processes and electrocatalytic properties of IrO₂/TiO₂/SnO₂ oxide films investigated by in situ AC impedance measurements. *Electrochim. Acta* **44**, 4203–4216 (1999).
 137. Liu, Y., Li, Z. & Li, J. IrO₂/SnO₂ electrodes: Prepared by sol-gel process and their electrocatalytic for pyrocatechol. *Acta Mater.* **52**, 721–727 (2004).
 138. Xiong, R. *et al.* The influence of *Bacillus subtilis* on tin-coated copper in an aqueous environment. *RSC Adv.* **8**, 4671–4679 (2018).
 139. Xu, L. K. & Scantlebury, J. D. A study on the deactivation of an IrO₂-Ta₂O₅ coated titanium anode. *Corros. Sci.* **45**, 2729–2740 (2003).
 140. Schwan, H. P. Alternating current electrode polarization. *Biophysik* **3**, 181–201 (1966).