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

JULIO CESAR COLPO DA SILVEIRA

CIMENTOS ÓSSEOS ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO E ALFA FOSFATO TRICÁLCICO DE DUPLA PEGA: DESENVOLVIMENTO/CARACTERIZAÇÃO PARA FINS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS E VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
JULIO CESAR COLPO DA SILVEIRA

CIMENTOS ÓSSEOS ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO E ALFA FOSFATO TRICÁLCICO DE DUPLA PEGA: DESENVOLVIMENTO/CARACTERIZAÇÃO PARA FINS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS E VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Tese 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 Doutor em Engenharia.

Área de Concentração: Ciências dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos

Porto Alegre

2017

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
Coordenador Substituto: Afonso Reguly

JULIO CESAR COLPO DA SILVEIRA

CIMENTOS ÓSSEOS ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO E ALFA FOSFATO TRICÁLCICO DE DUPLA PEGA: DESENVOLVIMENTO/CARACTERIZAÇÃO PARA FINS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS E VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Esta Tese foi analisada e julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Engenharia, área de concentração em Ciência dos Materiais, e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora designada pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos

Aprovada em 17 de novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Silvia Regina Grando

Prof. Dr. Tiago Moreno Volkmer

Prof. Dra. Vanessa dos Anjos Baptista

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo Denirio Marques
pela paciência, respeito e tolerância nestes anos
de entrega "quase que" exclusiva aos estudos...
espera-me, logo estarei pleno em casa,
Te amo!

In memoriam
às gatinhas Pérola Rebecca e Tábbata Regina
com as quais ao longo de 19 e 16 anos, respectivamente,
tive o privilégio de conviver e colher amor.
Há vida nas lembranças!!! Saudades...

Também ao meu orientador por aceitar um
enfermeiro num campo da engenharia.
Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

A vida, pela força e luz nos momentos de solidão!

Ao meu orientador Dr. Luís Alberto dos Santos, que me acolheu no mundo da pesquisa, em especial pela paciência para que eu chegasse até aqui. Mesmo sendo oriundo de uma formação inicial "distante" das engenharias, acreditou na teoria da interdisciplinaridade e aceitou, neste renomado programa de pós-graduação, o desafio de formar doutor em engenharia de materiais um enfermeiro. Obrigado pela possibilidade de "libertar" um pequeno projeto de liberação! O meu agradecimento e admiração pelo profissional que és! **Valeu L.A.!!**

A professora Vânia, por ter repetido incansavelmente as mesmas explicações sobre a rede cristalina...

Ao professor Pepito (Jose Ramon Jurado Egea), por ter me mostrado que o tempo não é empecilho à busca de novos conhecimentos e desafios.

Ao amigo e farmacêutico Everton Cristian Morais, pela cumplicidade, estímulo e paciência, por ensinar-me a operar alguns equipamentos e pela obtenção de um dos fármacos junto ao laboratório Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos, a quem também agradeço.

Aos ensinamentos e ajuda dos colegas de laboratório LABIOMAT: Camila Escobar, Douglas Marques, Tiago Delbrücke, Kétner Demétrio, Mônica Thürmer, Juliana Machado, Nathália Muniz, Fernanda Vecchietti, entre outros. Em especial: ao Wilbur Trajano, que preparou o cimento que utilizei no estudo; à Antoniella Ingrassia, bolsista do meu projeto; e, tão especialmente, às minhas queridas colegas e amigas engenheiras químicas Carol Pigatto e Nayrim Brizuela pelo acolhimento, ajuda, compartilhamento de alegrias e apoio nas horas mais difíceis. Um beijo, gatas, e meu MUITO OBRIGADO!!

Ao Dr. Javier Aragón e Ms. Carla Demarchi, pelo pronto auxílio quanto aos cálculos da cinética e a Prof. Dra. Vanessa Baptista pela orientação estatística.

Aos laboratórios da UFRGS que realizaram alguns ensaios ou facilitaram o uso de equipamentos: Instituto de Química, Lacer, Lacor e Lapol.

Ao laboratório Cristália pela gentileza da cedência dos fármacos anestésicos locais.

Ao pessoal da Metrohm, em especial a Maria Manuela. Obrigado pelas instruções!

Ao PPGE3M UFRGS, pela recepção neste conceituado programa.

Aos colegas da Anvisa, do PVPAF Porto Alegre e CVPAF/ RS, pelo acolhimento e estímulo para seguir em frente. Em especial à minha chefia Marta Bolson e Izaura Streit; Aos colegas: Joel Pavão, Jordan Martini, José Luiz Kloekner, Maria Aparecida Araújo (Cida), Maria Ivoni Klafk, Paulo Carvalho e Daniel Mota. Também às colegas e coordenadoras Inês Mallmann (gestora quando iniciei o processo) e à minha atual gestora Mauda Veis, a qual foi fundamental para a finalização deste projeto.

À Márcia Cardozo Amaral que além de cuidar de mim, teve a paciência e sensibilidade de organizar os tantos artigos, livros, cadernos, etc. espalhados pela casa. Obrigado Márcia!

À minha família que compreendeu e respeitou minhas inquietações e ausências. Mesmo que ao longe, estiveram presentes em pensamentos e boas energias.

Aos meus amigos, os quais escolhi participarem da minha vida, que ouviram minhas lamúrias, que me deram forças nas horas mais terríveis em que pensei abandonar tudo. Muito obrigado pelo colo, pelas palavras de ânimo, pelos momentos de descontração e risadas: Dora Bragança, Marcelo Ordóñez, Marcos Gimenez, Merli Leal, Michelle Antunes, Wladimir Esteves e Vanessa Baptista.

E, tão importante quanto, ao meu companheiro Denirio Marques, sempre presente e torcendo por mim! Obrigado Deni, te amo!

EPÍGRAFE

"A vigilância sanitária precisa ter um forte conhecimento daquilo que ela regula."

Geraldo Lucchese

"Se não for hoje, um dia será. Algumas coisas, por mais impossíveis e malucas que pareçam, a gente sabe, bem no fundo, que foram feitas para um dia dar certo."

Do meu conterrâneo santiaguense*: Caio Fernando de Abreu*

RESUMO

A ortopedia e a odontologia têm especial interesse às tecnologias biocompatíveis que apresentam a fase alfa do fosfato tricálcico (α-TCP), pois estas são capazes de formar hidroxiapatita deficiente em cálcio, similar à óssea. Porém, a baixa resistência mecânica limita sua aplicação. A fim de superar essa limitação, foi agregada acrilamida ao cimento α-TCP, com redutor de líquido, originando o cimento α-TCP de dupla pega. A partir disso foram desenvolvidos compostos à base de cimento de α-TCP e α-TCP de dupla pega agregados dos fármacos sulfato de gentamicina, cloridratos de lidocaína, bupivacaína e levobupivacaína e testada sua funcionalidade como sistemas de liberação de fármacos. Não existem dados bibliográficos sobre liberação de fármacos por sistemas de cimento α-TCP de dupla pega. A metodologia utilizada foi qualiquantitativa. Para as diferenças analíticas considerou-se o intervalo de confiança de 95% com nível de significância menor que 5% ($p<0,05$). O estudo compreendeu três fases. Na Fase 1 foram elaborados corpos de prova à base de cimento α-TCP e α-TCP de dupla pega com e sem (grupo-controle) adição de fármacos. Na Fase 2 os biomateriais estudados foram caracterizados por difração de raios X, espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, resistência mecânica a compressão axial, densidade, porosidade e absorção de líquido; sendo também proposta a análise da porosidade por meio de imagens. A Fase 3 corresponde ao estudo da cinética da liberação dos fármacos *in vitro,* onde os corpos de prova foram imersos em solução tampão fosfato pH 7,0 e as amostras analisadas por meio de UV-vis. A liberação do antibiótico também foi avaliada por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), como proposta inovadora. Conforme os resultados, ambos os cimentos funcionaram como sistemas de liberação dos fármacos. Tanto o sistema hidrogel, quanto os fármacos não modificaram as propriedades estruturais do cimento. O sistema com hidrogel apresentou melhor resistência mecânica. A difusão Fickiana foi o principal mecanismo envolvido no processo de liberação dos fármacos, com menor influência do relaxamento das cadeias. A técnica de EIS mostrou-se promissora para avaliação de liberação de fármacos.

Palavras-chave: Biomaterial. α-TCP. Sistema de liberação de fármacos. Regulação sanitaria.

ABSTRACT

To better regulate it is necessary to know the new Technologies. Orthopedics and dentistry have demonstrated special interest in biocompatible technologies that present the alpha phase of tricalcium phosphate (α-TCP), whit can form calcium-deficient hydroxyapatite (like bone hydroxyapatite). However, its application is limited by the low mechanical resistance. To overcome this limitation, acrylic hydrogel containing liquid reducer was added to the α-TCP cement, resulting in the α-TCP double setting cement. From this, composites of α-TCP and α-TCP double setting cements aggregates of the drugs gentamicin sulfate, lidocaine, bupivacaine and levobupivacaine hydrochlorides were developed and the functionality drug delivery systems was tested. There isn't bibliographic data about drugs release systems by α-TCP double setting cement. Qualitative and quantitative methodologies were applied. For the analytical differences, we considered the 95% confidence interval with a level of significance lower than 5% ($p < 0.05$). It comprised three different phases. In Phase 1, an α-TCP and α-TCP double setting cement specimens were prepared with and without (control group) drugs addition. In Phase 2, the studied biomaterials were characterized by X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, compression mechanical resistance, density, porosity and liquid absorption, being also proposed of the porosity analysis by images. The Phase 3 corresponds to the study of the in vitro drug release kinetics. The specimens were immersed in phosphate buffer solution pH 7.0 and the samples analyzed by UV-vis. As an innovative proposal, drug release was also assessed using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS). According to the results, both cements functioned as controlled drug delivery systems. The hydrogel improved the properties of cement moreover the drugs did not impair these properties. Fick diffusion was the main mechanism involved in the process of drug release by composites, with a minor influence of polymer chain relaxation. The EIS technique proved to be promising for the evaluation of drug release.

Keywords: Biomaterial. α-TCP. Drug delivery system. Health regulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. (a) Índice terapêutico com picos, sugerindo a administração das doses em tempos distintos; (b) Manutenção do índice terapêutico na linha do tempo, com administração de apenas uma dose. 30
Figura 2. Perfis de liberação de fármacos 32
Figura 3. Fórmula estrutural do sulfato de gentamicina 35
Figura 4. Fórmula estrutural dos anestésicos locais: A- cloridrato de lidocaína; B- cloridrato de bupivacaína; C- cloridrato de levobupivacaína 39
Figura 5. Desenho esquemático da metodologia desenvolvida 50
Figura 6. Nomenclatura das amostras utilizadas no estudo 54
Figura 7. Análise Granulométrica do pó de cimento α-TCP 65
Figura 8. Difratogramas de raios X: (A) pó do cimento α-TCP anterior a reação de pega; (B) grupos que compõem os subconjuntos Pré-testes dos cimentos α-TCP e α-TCP DP. Sendo α= fase α-TCP, H= hidroxiapatita e β= fase β-TCP 67
Figura 9. Difratogramas de raios X para os grupos que compõem os subconjuntos Pós-testes dos cimentos α-TCP e α-TCP DP, sendo H= hidroxiapatita e β= fase β-TCP 69
Figura 10. FT-IR do pó de α-TCP (sem hidratação), e dos cimentos α-TCP e α-TCP DP Controle após hidratação, com identificação do grupamento químico característico da CDHA (negrito) 70
Figura 11. FT-IR das amostras de cada grupo que constituiu o subconjunto Pré-teste: (A) subconjunto cimento α-TCP; (B) subconjunto cimento α-TCP DP 71
Figura 12.Fotomicrografias eletrônicas de varredura com imagens dos diferentes grupos que integram os subconjuntos Pré e Pós-testes (X4,500). Coluna da esquerda os grupos que compõem o subconjunto pré-teste e à direita os grupos que compõem o subconjunto pós-teste 76
Figura 13. Fotomicrografias eletrônicas de varredura em diferentes aumentos comparando as imagens pré-testes dos grupos α-TCP Bupi (coluna da esquerda) e α-TCP DP Bupi (coluna da direita), com a presença dos “bigodes de gatos”, e as imagens pós-testes dos grupos α-TCP Bupi (coluna da esquerda) e α-TCP DP Bupi (coluna da direita), sem os “bigodes de gatos” 78

Figura 14. Fotomicrografia eletrônica de varredura com aumento de 2.000 X (10 µm): A- grupo Pré α-TCP DP Bupi com destaque (setas amarelas) de fraturas dos “bigodes de gatos”; B- grupo Pós α-TCP DP Bupi sem os “bigodes de gatos” 79
Figura 15. Diferenças entre as médias de acordo com as variáveis analisadas para a Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente e Absorção de líquido (N= 50) 81
Figura 16. Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos conjuntos Pré e Pós-teste, onde (a) representa a figura sem destaque aos poros e (b) representa a mesma figura (a) com destaque aos poros de área entre 70 e 400 µm 91
Figura 17. Relação entre o tamanho de poros entre 70 e 400 µm de acordo com os grupos que compõem os subconjuntos Pré e Pós-testes 92
Figura 18. Representação entre a porosidade total e entre 70 e 400 µm de acordo com os grupos que compõem os subconjuntos Pré-testes 92
Figura 19. Comparação entre a análise da porosidade aparente pelo método de Arquimedes (linha azul) e o método por análise de imagens pelo software ImajeJ desenvolvido neste estudo (linha vermelha) 94
Figura 20. Comparações múltiplas entre médias de poros com tamanho entre 70 e 400 µm (log 10) dos subconjuntos e grupos de estudo. Cada cor trata de um grupo e seu respectivo subconjunto 95
Figura 21. Comportamento em relação à média da resistência mecânica à compressão axial entre os diferentes subconjuntos e grupos estudados. Cada cor trata de um grupo e seu respectivo subconjunto (N= 150) 97
Figura 22. Relação entre resistência mecânica e porosidade aparente para os subconjuntos Pré-teste e Pré-teste DP 99
Figura 23. Perfil do percentual acumulado de liberação dos fármacos agregados aos conjuntos cimentos α-TCP (linha preta) e α-TCP DP (linha vermelha) em relação ao tempo. Sendo: gráfico (A) o perfil de liberação do sulfato de gentamicina, (B) do cloridrato de lidocaína, (C) do cloridrato de bupivacaína e (D) do cloridrato de levobupivacaína 102
Figura 24. Graficos de regreção linear entre perfil de liberação (%) e concentração (mg) para cada grupo de fármacos contidos nos conjuntos estudados. (A) Diferenças entre o percentual de liberação; (B) Diferenças entre a concentração (mg); (C)

Correlação entre o tempo e o percentual de liberação para todos os grupos; (D) Correlação entre o tempo e a concentração (mg) para todos os grupos 103
Figura 25. Perfil de liberação dos fármacos estudados de acordo com o modelo de Peppas-Sahlin. A linha contínua representa o modelo matemático que identifica o mecanismo de liberação, os pontos constituem o percentual de liberação em função do tempo. A cor vermelha corresponde aos sistemas formados pelos conjuntos de cimento α-TCP DP; e a cor preta, aos sistemas formados pelos conjuntos de cimento α-TCP. O gráfico menor representa 60% da liberação 107
Figura 26. Apresentação do circuito equivalente R (RC) (RC) e do Diagrama de Nyquist da solução proveniente do grupo controle 112
Figura 27. Diagrama de Nyquist com comparação das soluções provenientes dos corpos de prova do grupo controle e dos corpos de prova adicionados de SG em relação aos diferentes tempos de coletas (white= grupo controle, g1=dia 1, g2=dia 2, g3=dia 3, g4= dia 4, g8= dia 8 e g15= dia 15) 113
Figura 28. Relação entre a Resistência (Ω) em função do tempo (dias) de estudo. A linha R1 representa a Rtampão e a linha R2 a resistência do sulfato de gentamicina 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição para a constituição do cimento α-TCP de dupla pega..... 51
Tabela 2. Número de amostras em função dos ensaios, considerando os grupos, subconjuntos e conjuntos estudados 55
Tabela 3. Distribuição e tamanho médio de partícula do pó de cimento α-TCP 65
Tabela 4. Equações da reta e coeficientes de determinação (R^2) para as curvas obtidas (n=3)..... 101
Tabela 5. Constantes de liberação e coeficientes de correlação das equações matemáticas aplicadas na liberação dos sistemas estudados. Com destaque ao modelo que melhor explicou a cinética encontrada neste estudo..... 105

LISTA DE ABREVIAÇÕES

α-TCP - Fase alfa do fosfato tricálcico;

α-TCP DP - Fase alfa do fosfato tricálcico de dupla pega;

β-TCP - Fase beta do fosfato tricálcico;

AbL – Absorção de Líquido

AL – Anestésico Local;

CDHA - Hidroxiapatita deficiente em cálcio;

CFC - Cimento de Fosfato de Cálcio;

DA - Densidade aparente;

DPA – Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente, Absorção de líquido;

DR – Densidade real;

DRX - Difração de raios X;

EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

FT-IR - Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourrier;

GDL – Granulometria por difração a laser;

GPa – Giga Pascal;

HA - Hidroxiapatita;

IC – Intervalo de Confiança;

ICDD - International Center for Diffraction Data;

kg - Quilograma;

MA – Método de Arquimedes;

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura;

ml - Mililitro;

mm - Milímetro;

mm^2 - Milímetros quadrados;

MPa - Mega Pascal;

MS - Massa seca;

nm – Nanômetro;

PA - Porosidade aparente;

PAI - Porosidade por análise quantitativa de imagens;

PBS - Phosphate Buffered Solution (solução tampão fosfato salino);

Pi – Peso imerso;

pl – Densidade do meio líquido;

PMMA - Poli(metilmetacrilato);

Ps – Peso seco;

Pt – Porosidade total

Pu – Peso úmido;

RMC – Resistência mecânica à compressão axial;

SBF - Simulated body fluid (fluido corporeo simulado);

SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária;

TCP - Fosfato tricálcico;

UV - Ultravioleta;

µm – Micrômetro;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 OBJETIVO GERAL 23

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 24

3.1 Cimento Alfa Fosfato Tricálcico 24

3.2 Sistemas Implantáveis de Liberação de Fármacos 28

3.2.1 Cinética de liberação controlada de fármacos 31

3.3 Fármacos teste 35

3.3.1 Sulfato de Gentamicina 35

3.3.2 Anestésicos Locais 38

3.4 vigilância E Regulação Sanitária 43

4 MATERIAIS E MÉTODOS 48

4.1 BASES DE DADOS E ESTRATÉGIA DE BUSCA 48

4.1.1 Critérios de seleção e exclusão de publicações 49

4.1.2 Publicações selecionadas 49

4.2 Desenho do estudo *in vitro* 49

4.3 PREPARO DAS PASTAS CIMENTÍCIAS 51

4.4 FASE 1: ELABORAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA 52

4.5 FASE 2: CARACTERIZAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA 53

4.5.1 Número Amostral 55

4.5.2 Granulometria por difração a *laser* 55

4.5.3 Difração de raios X 56

4.5.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier 56

4.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura 56

4.5.6 Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente, Absorção de líquido pelo Método de Arquimedes 57

4.5.7 Análise quantitativa e mensuração de tamanho de poros por imagens 58

4.5.8 Resistência Mecânica à Compressão Axial 59

4.5.9 Erros de Medidas 60

4.6 FASE 3: AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS *IN VITRO* 60

4.6.1 Estudo da Cinética de Liberação dos Fármacos 62

4.6.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) 63
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO....65
5.1 GRANULOMETRIA POR DIFRAÇÃO A *LASER*....65
5.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X....67
5.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER 70
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 73
5.5 MÉTODO DE ARQUIMEDES E ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO E TAMANHO DE POROS POR IMAGENS 80
5.5.1 Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente e Absorção de líquido 80
5.5.2 Análise de quantificação e tamanho de poros por imagens....83
5.6 RESISTÊNCIA MECÂNICA À COMPRESSÃO AXIAL 97
5.7 LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS ESTUDADOS 101
5.7.1 Perfil de Liberação *in vitro* 101
5.7.2 Cinética de liberação de fármacos....105
5.8 ESPETROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA....112
CONCLUSÃO....115
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 117
REFERÊNCIAS 118
Anexo I - Tabela com os resultados das análises das medidas de tendência central para os diferentes subconjuntos e grupos amostrados para a Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente e Absorção de líquido. 135
Anexo II - Tabela com as diferenças analíticas entre as médias de acordo com as variáveis analisadas para a densidade aparente, porosidade total, porosidade aparente e absorção de líquido.....137
Anexo III - Resumo descritivo dos grupos de corpos de prova submetidos ao ensaio de resistência mecânica, teste de compressão axial (MPa). 139
Anexo IV - Comparações múltiplas utilizando teste não paramétrico, considerando as diferenças entre as resistências mecânicas a compressão axial (MPa) dos subconjuntos e grupos estudados. 140
Apêndice....142

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos propiciam o desenvolvimento de produtos, equipamentos e sistemas que auxiliam na manutenção da vida, favorecendo a conquista de sua melhor qualidade. Assim, são de interesse à saúde, os produtos compostos ou substâncias de origem sintética ou natural capazes de reproduzir alguma propriedade da matéria viva que deixou ou está limitada de exercer sua função e que possa servir como matriz, veículo, suporte ou estimulador para o crescimento de novos tecidos, ou seja, materiais biocompatíveis (WILLIAM, 1987).

Os biomateriais, de uma forma mais completa, podem ser definidos como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias que podem ser utilizadas de forma transitória ou permanente para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente, diversos tecidos ou órgãos dos seres vivos (PARK, 1984; SANTOS *et al*., 1999; MORAES, 2004).

Park (1979) amplia o conceito de biomateriais quando aponta que podem agir de modo contínuo ou intermitente, entrando em contato com fluidos corpóreos, mesmo que localizados fora do corpo.

Quanto à sua natureza, França et al. (2005) classificam os biomateriais em sintéticos (polietileno, politetrafluoretilenos, acrilatos, silicones, malhas de polímeros, materiais cerâmicos, vidros bioativos, adesivos tissulares) ou naturais (osso, colágeno, córnea, cartilagem).

Sintéticos ou naturais, todos os biomateriais utilizados em implantes devem ser bem tolerados pelo organismo hospedeiro. À exceção do material autólogo, todos os outros provocam, em maior ou menor grau, alguma resposta imunológica reacional (RANG *et al*., 2015).

Segundo França et al. (2005, p.426):

> A pesquisa de material biocompatível busca encontrar um substituto do tecido humano que não desencadeie distúrbio imuno-histoquímico nocivo, e também interaja favoravelmente com o tecido hospedeiro, aproximando-se ao máximo das qualidades exigidas pela função específica a ser exercida por aquele órgão ou tecido reparado.

Assim, o desenvolvimento de materiais considerados bioativos e biodegradáveis vem ganhando muito interesse, pois,

> [...] além de substituir tecidos traumatizados, estes materiais também podem propiciar a recuperação do tecido danificado através da atuação em metabolismos intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento (PEREIRA et al., 1999, p.105).

Os biocerâmicos, como os vitrocerâmicos e materiais cerâmicos, podem ser capazes de estimular o crescimento tecidual (OTSUKA et al., 1990; YU et al., 1992; KAMEGAI et al., 1994; OTSUKA et al., 1994a; OTSUKA et al., 1994b; OTSUKA et al., 1994c; TUNG, 1995; BOHNER et al., 1997). Os biocerâmicos conhecidos como cimentos ósseos são utilizados em diversas áreas da saúde, inclusive, substituindo um órgão ou como suporte à execução de suas funções, a exemplo das próteses na ortopedia e cardiologia, como órgãos artificiais, materiais para a reparação e sustentação de tecidos e, ainda, como sistemas implantáveis de liberação de fármacos (FOLKMAN, 1990).

Tais sistemas, também, podem ser utilizados como veículos ou transportadores para entrega/liberação de um princípio ativo/fármaco em um determinado sítio/órgão do organismo (JOSUE, 2000). A incorporação de fármacos em biomateriais implantáveis apresenta a vantagem de liberá-los diretamente no sítio desejado e em concentrações predeterminadas, mantendo o índice terapêutico estável no período conveniente, ou seja, o princípio ativo é liberado de acordo com a cinética envolvida no fenômeno, resolvendo, assim, os possíveis inconvenientes advindos dos sistemas convencionais de administração de medicamentos (OGAWA, 2002).

Biocerâmicos conhecidos como Cimento Fosfato de Cálcio (CFC), compõem o grupo dos biomateriais cerâmicos de grande interesse à saúde, pois, além de sua estrutura inorgânica ser similar ao osso, são biocompatíveis (ABUKAWA et al., 2006; DÓREA NETO, 2007; MORAES, 2002, SANTOS 2002). São capazes de reproduzir determinada propriedade do organismo que deixou ou está limitado de exercer sua função, servir de matriz, veículo, suporte ou estimulador para o crescimento do tecido ósseo (MIRTCHI et al., 1989; SANTOS 2002; OLIVEIRA et al., 2009; KOKER et al., 2011).

É um desafio elaborar novos produtos implantáveis de sistemas de liberação de fármacos que possam produzir efeitos terapêuticos adequados e eficientes no tratamento de diferentes patologias, desse modo, minimizando tanto os riscos

relacionados aos efeitos colaterais comuns, em sistemas convencionais (via oral e parenteral), como proporcionar maior adesão ao tratamento, conforto e segurança do paciente.

Os sistemas de liberação de fármacos são baseados quase exclusivamente em materiais poliméricos. São escassos os trabalhos que focalizam o uso de cimento à base de α-TCP como sistema para liberação de fármacos. Apesar desse sistema apresentar baixa resistência mecânica, dada a sua notável afinidade com o tecido ósseo, possui elevado potencial de aplicação no sistema esquelético (GRISTINA; COSTERTON, 1985; STENGEL et al., 2001; MORAES, 2002; SANTOS, 2002; LAZZARINI et al., 2004; DÓREA NETO, 2007).

Os cimentos α-TCP apresentam a propriedade de produzir uma fase de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) durante a reação de pega. Esta fase é de grande interesse por se assemelhar à hidroxiapatita óssea, o que proporciona excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteointegração: $3Ca_3(PO_4)_2 + H_2O \rightarrow Ca_9(HPO_4)\ (PO_4)_5OH$ (SANTOS, 2002). Tal propriedade confere a esse cimento o potencial de ser utilizado como sistema de liberação controlado de fármacos. Nesse sentido, o desafio de melhorar tanto a manutenção da analgesia quanto da antibioticoterapia, poderá ser viabilizado a partir de sistemas de liberação de fármacos à base de cimento α-TCP, pois sua microestrutura composta por partículas nanométricas de hidroxiapatita propicia um elevado carregamento de fármacos e liberação por longos períodos (SANTOS, 2002).

Os avanços tecnológicos permitem desenvolver diversos biomateriais e implementar melhorias nestes, a exemplo de estudos envolvendo os cimentos α-TCP que objetivam ampliar sua aplicação em saúde por meio do desenvolvimento de cimento α-TCP por via úmida e cimento α-TCP de dupla pega (SANTOS et al., 1999; SANTOS, 2002; THÜRMER et al., 2012a; THÜRMER et al., 2012b).

O cimento α-TCP de dupla pega (SANTOS, 2002) é constituído de cimento e acrilamida contendo redutor de líquido. Além de apresentar um elevado valor de resistência mecânica à compressão, quando comparado a outros cimentos de fosfato de cálcio comerciais, apresenta biocompatibilidade, osteointegração e bioabsorção lenta em estudos *in vivo* (MORAES, 2002; DÓREA NETO, 2007).

A aplicação de um biomaterial à base de cimento α-TCP de dupla pega é uma inovação, até o momento não descrita em literatura, que poderá viabilizar a liberação

controlada de medicamentos, visto que suas propriedades agregam maior resistência mecânica que sua forma convencional, o que poderá ampliar sua aplicação, além de tratar-se de material inovador com tecnologia nacional.

Muitas técnicas são utilizadas para avaliar a cinética de liberação de fármacos, algumas destrutivas e outras requerem a retirada de alíquotas, a exemplo do método de espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-vis). Já a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) pode ser explorada como uma técnica não destrutiva e instantânea, ou seja, pode ser usada em todas as fases de realização do experimento sem destruir as amostras.

Dessa forma, além do desenvolvimento desses sistemas de liberação de fármacos, é importante o desenvolvimento de metodologias que avaliem essa liberação, contribuindo para melhor conhecimento regulatório e aplicação desses biomateriais de forma segura. Até o presente momento não foi encontrada pesquisa envolvendo o cimento α-TCP de dupla pega como sistema de liberação de fármacos, tão pouco o uso da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) como método de avaliação da liberação de fármacos *in vitro*.

Por isso, desenvolver sistemas de liberação a partir de um novo biomaterial (cimento α-TCP de dupla pega) que apresenta similaridade química superficial com o osso, adicionado de fármacos e comparar as propriedades e os processos envolvidos na cinética de liberação desses fármacos com seu análogo (cimento α-TCP isento de acrilamida), é importante para ampliação da aplicação e disponibilização futura à saúde pública, além da aquisição de conhecimentos necessários à regulação sanitária.

2 OBJETIVO GERAL

Obtenção e caracterização de sistemas de liberação de fármacos à base de cimento α-TCP e α-TCP de dupla pega.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as cinéticas comportamentais observadas no estudo *in vitro*, entre os diferentes biomateriais estudados.
- Avaliar o uso da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica como método de avaliação de concentração de fármacos em meios líquidos.
- Agregar ao estudo a importância da regulação e vigilância sanitária.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CIMENTO ALFA FOSFATO TRICÁLCICO

Em cirurgias ortopédicas a reparação ou regeneração óssea é um problema clínico comum e complexo (ARAGÓN et al., 2012). De acordo com esse autor, anualmente pessoas sofrem por defeitos ósseos decorrentes de doenças e traumas, sendo que muitas vão a óbito devido à falta de substitutos ósseos compatíveis.

Os sistemas à base de cimento α-fosfato tricálcico (α-TCP) compõem o grupo dos biomateriais cerâmicos de grande interesse à saúde e, em especial, à ortopedia. São materiais biocompatíveis e bioativos devido à similaridade química superficial com o osso e demais tecidos circundantes e, por isso, podem ser reabsorvidos enquanto promovem a regeneração óssea (MORAES, 2002; ABUKAWA et al., 2006; DÓREA NETO, 2007; LEE; SHIN, 2007; VERRON, et al., 2010), mas, também, em razão da sua capacidade de formar uma fase de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) [$Ca_9(PO_4)5(HPO_4)$ (OH)], similar à hidroxiapatita óssea (SANTOS, 2002). De acordo com Monma (1976), essa capacidade de formar CDHA é exclusiva do α-TCP em relação aos demais cimentos fosfato de cálcio (CFC).

A fase mineral dos tecidos ósseos, incluindo dentes, é formada, em quase sua totalidade, por CDHA, responsável por promover as ligações químicas com a matriz óssea, assim, favorecendo a proliferação de células ósseas, em especial, os fibroblastos e osteoblastos (HENCH, 1998).

A superfície compacta do osso possui poros de 1 a 100 μm, a região central é composta pela medula óssea de onde emergem as trabéculas, que se estendem até o osso compacto, dando origem ao osso trabecular ou esponjoso com poros de 200 μm a 400 μm (LEGEROS, 2002; TIRREL et al. 2002).

Nagem (2006) coloca que 100 μm é o tamanho mínimo para o crescimento celular e a angiogênese em um arcabouço. Van Lenthe et al. (2007) relatam que é necessário no mínimo 30 a 50 μm; e Arens et al. (2011) citam a variação de 30 a 250 μm para aumento da osteoindução. Já Anderson et al. (2008) relatam que o tamanho e a forma do poro são essenciais para a regeneração óssea, poros de diâmetro maior melhoram tanto o transporte de massa quanto a neovascularização no interior de implantes, e os de menor diâmetro promovem a razão área por

volume. Segundo este autor, o tamanho de poro ideal para o crescimento do osso no interior do implante está entre 75 e 250 µm.

Percebeu-se que ainda não há um consenso definido sobre o tamanho adequado do poro para a formação ou o crescimento do tecido ósseo. Conforme Roosa et al. (2010), poros entre 10 e 2250 µm promovem diferentes níveis de desenvolvimento tecidual.

A porosidade dos CFC permite sua aplicação como sistemas de liberação de fármacos dada sua capacidade de incluir o agente ativo nesses poros e liberá-lo de forma regionalizada, além de favorecer a biocompatibilidade, osteocondução e osteoindução (NANDI et al., 2008; NANDI et al., 2009). Sendo que, de acordo com Klawitter et al. (1971), para a manutenção da liberação sustentada de fármacos no osso, os poros devem ser grandes (~ 100 µm), de forma a permitir o crescimento ósseo para dentro dos poros, e também poros menores a fim de armazenar e promover a liberação lenta dos fármacos.

Além da porosidade e estrutura inorgânica dos cimentos α-TCP apresentar similaridade química superficial com o osso (SANTOS et al., 1999; SANTOS, 2002; THÜRMER et al., 2012a), possuem a facilidade de aplicação local, visto que o endurecimento pode ocorrer *in situ* (DRIESSENS et al., 1993), além de promoverem integração óssea, pois as células não distinguem diferenças entre a superfície óssea e a hidroxiapatita (MIRTCHI et al., 1989; HENCH, 1998; KOKER et al., 2011).

Os cimentos α-TCP, da mesma forma como os CFC (GRUNINGER et al., 1984), são constituídos a partir de uma fase sólida (pó) e outra líquida, que misturadas, formam uma pasta, a qual, à temperatura ambiente ou corporal, endurece em poucos minutos (DRIESSENS et al., 1993). Essa pasta formada é de fácil manipulação, o que amplia sua aplicação em saúde, pois, além de ser facilmente moldável pode ser acomodada ou preencher pequenas cavidades, dependendo da quantidade da fase líquida ou pela adição de aditivos, pode ser, inclusive, injetada na região corpórea de interesse, desde que não impeça a precipitação de hidroxiapatita (LEROUX et al., 1999; FERNÁNDEZ et al., 2005a). Após o endurecimento, esse cimento apresenta uma resistência mecânica similar ao osso esponjoso (trabecular), o que limita sua aplicação em regiões que requeiram maior resistência (SANTOS et al., 2000).

Muitos estudos têm buscado superar tal limitação e melhorar suas propriedades mecânicas, por meio da aplicação de novos métodos de calcinagem, como, também, por meio da adição de novos compostos ao cimento (SANTOS et al., 2000).

Viera et al. (2012) obtiveram maior resistência mecânica à compressão e ao aumento da densidade aparente, com menor quantidade de poros do cimento α-TCP quando calcinado à temperatura de 1500ºC. Thürmer et al. (2012b), utilizando o método de síntese por via úmida, obteve pós de cimento α-TCP de alta pureza. Coelho et al. (2012) e Fernandes et al. (2012) conseguiram aumentar a resistência do cimento com a adição de defloculantes e alginato de sódio.

Carrodeguas et al. (1999) desenvolveram o cimento α-TCP de dupla pega, resultado da adição de sistema de polimerização ao cimento tradicional, baseado na acrilamida (acelerador) e persulfato de amônia (iniciador). O hidrogel de poliacrilamida funciona como ligante entre as partículas do cimento, permitindo o aumento da resistência mecânica em função da polimerização do sistema de polímeros hidrossolúveis e, também, maior controle dos tempos de pega inicial e final pela precipitação de compostos de fosfatos de cálcio (SANTOS, 2002; SANTOS et al., 2005).

A utilização combinada do sistema de polimerização e do redutor de líquido permite aumentar a resistência mecânica à compressão, que passou de 23 MPa (composição isenta de aditivos) para 55 MPa (valor médio), ou seja, um aumento bastante superior ao que fora reportado na literatura (35 MPa). Sendo obtidos valores de até 68 Mpa, muito próximos ao recomendado pelas normas da *American Society for Testing and Materials* (ASTM F451-08) e *International Organization for Standartization* (ISO 5833) para cimentos ósseos de polimetilmetacrilato (70 MPa) (SANTOS et al., 2001).

O aumento da resistência mecânica dos cimentos é proporcional à redução da porosidade no material. No caso do cimento de α-TCP, ela pode ser atribuída à adição de poliacrilato de amônia, com defloculação do cimento (SANTOS et al., 2001).

No organismo, os cimentos de fosfato de cálcio são absorvidos por atividade osteoclástica, o qual gera, simultaneamente, um novo tecido ósseo na interface com o implante (SANTOS, 2002). Estudos experimentais com cimento de alfa-fosfato

tricálcico de dupla pega aplicados em rádios de coelhos (MORAES, 2002; SANTOS et al., 2005) e em artrodeses tarsocrurais de cães (DÓREA NETO, 2007) relatam a ocorrência de biocompatibilidade, osteointegração e bioabsorção lenta (MORAES, 2002).

Nesse sentido, a utilização desses cimentos como sistemas de liberação de fármacos poderá colaborar com a manutenção das concentrações de fármacos necessárias à efetividade do tratamento, visto que, segundo Soundrapandian et al. (2007), a principal razão atribuída ao insucesso no tratamento de osteomielites é a falha da manutenção da concentração de antibióticos no local da infecção, pois o tecido ósseo é pouco irrigado, em razão disso, necessitando de grande quantidade de antibióticos para atingir o nível terapêutico adequado na região afetada (JOOSTEN et al., 2004).

3.2 SISTEMAS IMPLANTÁVEIS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A área de estudo dos sistemas de liberação controlada de fármacos é interdisciplinar, pois é necessário somar conhecimentos da biologia, enfermagem, engenharia, farmácia, física, medicina, química, entre outros (COIMBRA, 2010).

Sistemas controlados de liberação de fármacos, além de constituir um campo de aplicação promissor para a saúde, representam tecnologias em constante evolução para a ciência de biomateriais (TORCHILIN, 2005; VALLET-REGÍ, 2006).

Ansel (2013) considera sistemas de liberação de fármacos uma tecnologia utilizada como veículo ou transportadora de fármacos para um determinado sítio do organismo onde o princípio ativo deve ser liberado, assim, otimizando o tratamento. Vallet-Regí et al. (2007) descrevem um sistema de liberação de fármacos como uma formulação ou um mecanismo que controla a taxa e o período de administração do fármaco em determinado sítio do organismo.

O desenvolvimento da biotecnologia favorece o avanço das ciências farmacêuticas por meio de pesquisas que desenvolvem novos agentes terapêuticos e aprimoram sua biodisponibilidade, que está diretamente associada com a quantidade de substância absorvida pelo organismo e disposta à circulação sistêmica (RANG et al., 2015). Essa disposição relaciona-se com o resultado do processo de dissolução, ou seja, o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e torna-se disponível para ser absorvido pelo organismo (CHOWDARY, 1987). Portanto, o teste de dissolução é um ensaio físico destrutivo, pois o fármaco passa da forma farmacêutica inicial para a solúvel.

No caso dos biomateriais utilizados como sistemas de liberação de fármacos, os testes de dissolução *in vitro* constituem uma importante ferramenta de controle de qualidade, pois permitem a identificação de variáveis críticas sobre o processo: efeitos terapêuticos, escolha entre diferentes formulações para sua otimização e a realização de avaliações de risco (MARCOLONGO, 2003).

A análise do perfil de dissolução *in vitro*, ou seja, a porcentagem de fármaco dissolvido em relação ao tempo decorrido permite reconhecer a cinética do processo, quantificar o fármaco liberado num determinado período de tempo, identificar a constante de velocidade de dissolução, evidenciar a meia-vida e eficiência de dissolução e quantificar e detectar períodos de latência. Também, serve

de base para avaliar e comparar o desempenho de formas farmacêuticas sólidas de diferentes procedências, desse modo, fornecendo parâmetros de correlação dos dados *in vivo* e *in vitro* (STORPIRTIS, 1999; FERRAZ, 1998).

Em estudos *in vitro* é importante simular o ambiente corpóreo humano (movimento dos fluidos e eletrólitos), correspondendo ao conceito de bioatividade definido por Silva Júnior e Orefice (2001). De acordo com Tang e Eaton (1995), todo biomaterial implantado desencadeia uma sequência de eventos no organismo. Ratner et al. (1996) definem tais sequências de eventos como “reações ao corpo estranho”. Entre essas reações, há a modificação do pH do tecido lesado e em processo de cicatrização que poderá variar entre pH 3.5 até sua estabilização, em torno de pH 7,4 (RANG et al, 2015).

Outra ferramenta de controle e segurança para fármacos é o bioensaio, que nada mais é que um conjunto de técnicas que permite avaliar tanto a concentração como a potência de uma substância pela medida da resposta biológica produzida (RANG et al., 2015).

Existem dois modelos de bioensaio – *in vitro* e *in vivo* –, utilizados para avaliar as propriedades de uma ou várias substâncias em diferentes circunstâncias, com isso, fornecendo dados que permitem predizer o efeito de fármacos em diversas situações clínicas. Ele é usado como medida de atividade farmacológica de substâncias novas ou quimicamente indefinidas, como investigação da função de mediadores endógenos e como medida de toxicidade e de efeitos indesejáveis em fármacos (RANG et al., 2015).

Tanto o teste de dissolução quanto os bioensaios são importantes ferramentas que auxiliam na predição do índice terapêutico, que é a diferença entre os níveis de concentração do fármaco, em que – acima das concentrações de uso – o medicamento produz efeitos colaterais indesejáveis e – abaixo – pode tornar-se não efetivo (FISCHBACH, 1998).

Nos sistemas mais comuns de administração de medicamentos (via intravenosa, intramuscular e oral), logo após a administração, o nível do medicamento aumenta rapidamente e decai exponencialmente à medida que o medicamento é metabolizado ou excretado (Figura 1(a)). Para um sistema ser considerado ideal, deve manter o índice terapêutico constante (Figura 1(b)), o que

melhora tanto a eficiência quanto a eficácia do tratamento (BRANNON-PEPPAS, 1997).

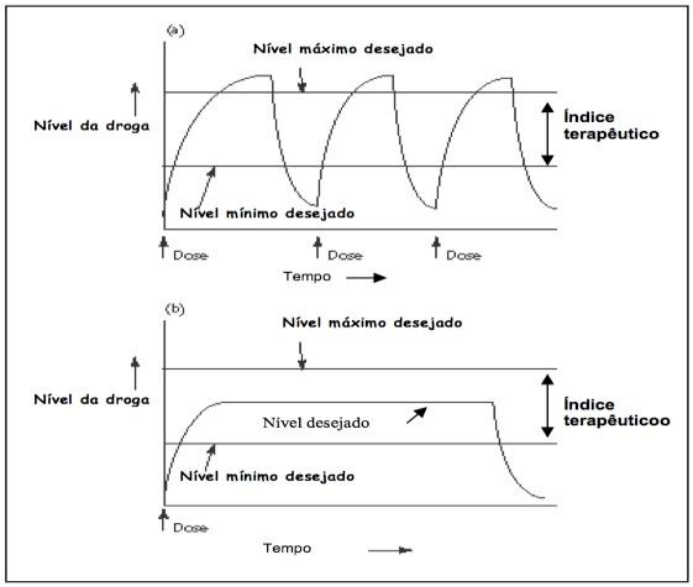


Figura 1. (a) Índice terapêutico com picos, sugerindo a administração das doses em tempos distintos; (b) Manutenção do índice terapêutico na linha do tempo, com administração de apenas uma dose.
Fonte: adaptado de Brannon-Peppas (1997, p.34).

Algumas doenças precisam de um tratamento contínuo em períodos de tempo variáveis e necessitam de manutenção constante do índice terapêutico no organismo (FOLKMAN, 1990; KONG et al., 2000; OGAWA; PLEPIS, 2002), a exemplo da prevenção de infecções nos pós-operatórios quando do implante de um biomaterial em um sítio do organismo ou quadros de dor aguda ou crônica (GRISTINA; COSTERTON, 1985; STENGEL et al., 2001; LAZZARINI et al., 2004).

A incorporação de fármacos em biomateriais implantáveis apresenta a vantagem de liberar o princípio ativo diretamente no sítio desejado e em concentrações predeterminadas, desse modo, mantendo o índice terapêutico estável por um período conveniente, ou seja, o fármaco é liberado de acordo com a cinética de liberação do sistema. E, assim, resolvendo os possíveis inconvenientes advindos dos sistemas convencionais de administração de medicamentos, cujos níveis podem chegar a altas concentrações logo após a administração, aproximando-se à toxicidade e, após, baixando, podendo ser ineficiente até que a próxima dose seja administrada e assim sucessivamente (OGAWA; PLEPIS, 2002), contribuindo para o conforto do paciente e a adesão ao tratamento (SILVA, 2012).

Na administração local ou tópica, o fármaco é administrado diretamente no tecido-alvo. Essa administração deve ser efetiva, apesar da dosagem reduzida, e deve, também, reduzir a exposição a outros tecidos (SIEGEL, 2012).

Os biomateriais que possuem a propriedade de bioabsorção lenta são de grande interesse, desde que apresentem o eminente potencial de utilização como sistemas de liberação controlada de fármacos. Tais sistemas visam, sobretudo, ao controle da taxa em que o fármaco deixa o meio. Isso é uma forma muito eficaz de monitorar a concentração de agentes terapêuticos no sangue, bem como um modo de melhorar sua biodisponibilidade (OGAWA; PLEPIS, 2002; CIRIMINNA et al., 2011).

Sistemas implantáveis para liberação de fármacos no tecido ósseo constituem-se em um dos conceitos terapêuticos mais promissores à ortopedia e odontologia. Uma vez que o tecido ósseo é pouco irrigado, tanto a administração oral quanto a intravenosa requerem altas doses para serem efetivas, pois a dosagem deve atingir a concentração necessária à eficácia. Os antibióticos, fatores de crescimento, agentes quimioterapêuticos, anti-inflamatórios, entre outros, são bons candidatos para as terapias relacionadas ao tecido ósseo (VALLET-REGÍ et al., 2007).

Sistemas de liberação de fármacos com propriedades biocompatíveis, absorvíveis e que promovam o crescimento ósseo seriam altamente desejáveis, neste caso, biomateriais constituídos por cimento α-TCP cumpririam essa condição.

3.2.1 Cinética de liberação controlada de fármacos

Sistemas de liberação controlada de fármacos auxiliam na manutenção temporal e espacial (sítio) desse fármaco no organismo, protegem da degradação ou eliminação fisiológica, melhoram tanto a eficiência da terapia medicamentosa quanto a adesão do paciente ao tratamento. Dessa forma, tais sistemas podem agregar valor comercial aos fármacos (SIEGEL, 2012).

Ao projetar tais sistemas, deve-se levar em conta a identificação e a compreensão dos principais mecanismos envolvidos no processo de liberação, em que, geralmente, mais de um mecanismo pode estar envolvido, seja de forma simultânea ou em diferentes fases de um processo de liberação (SIEGEL, 2012).

A figura 2, adaptada de Vallet-Regí et al. (2007), ilustra os perfis de liberação mais comuns de materiais mesoporosos. Segundo esses autores, o perfil (a) é observado para as matrizes não funcionalizadas, em que, inicialmente, ocorre maior liberação, seguida de uma liberação mais lenta. Esse perfil pode ser útil para tratamentos que necessitem de dose inicial mais elevada, como infecções agudas ou inflamações. O perfil (b) é pertinente a processos de difusão, característico de materiais porosos, por onde os fármacos difundem através do biomaterial para o meio líquido ou também pela bioabsorção da matriz do material. No perfil (c), o processo de liberação é dependente do tempo. Este modelo de perfil é esperado para sistemas de liberação em longo prazo. Já o perfil (d) retrata sistema mais sofisticado, cuja velocidade de liberação pode ser controlada por estímulos externos (pH, temperatura, campo magnético).

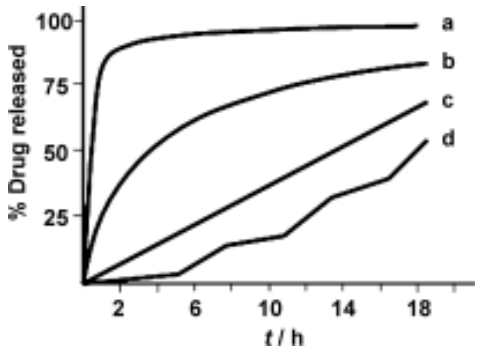


Figura 2. Perfis de liberação de fármacos
Fonte: Adaptado de Vallet-Regí et al. (2007).

Tanto para materiais polímeros quanto cerâmicos biodegradáveis, o principal mecanismo ou fenômeno envolvido na passagem do fármaco através da matriz do biomaterial é a difusão (RATNER, 1996; SIMÓ, 2003). Existem dois principais dispositivos envolvidos no fenômeno da difusão, o do tipo reservatório, pelo qual o fármaco está alocado em algum espaço específico do biomaterial; e os sistemas do tipo matriciais, em que o fármaco se encontra homogeneamente disperso na matriz ou adsorvido em sua superfície. Em mecanismos matriciais, a liberação do fármaco pode ocorrer por difusão através dos poros da matriz, por meio de bioabsorção ou pela combinação dos dois mecanismos (DASH; CUDWORTH, 1998; KIMURA; OGURA, 2001; CARBINATTO, 2010).

Essa difusão do fármaco através dos poros ou bioabsorção da matriz determina a cinética de liberação desse fármaco a partir do biomaterial, permitindo calcular e identificar informações úteis relacionadas ao mecanismo pelo qual ocorre

o processo de liberação (ARAGÓN et al., 2006; FERNANDÉZ et al., 2009; FERNANDÉZ et al., 2010).

Vários fatores interferem na difusão, tais como o meio de dissolução, o pH, a temperatura, a concentração do soluto no solvente, a solubilidade do agente ativo, a geometria do sistema, a permeabilidade, o volume livre entre as cadeias ou redes, a natureza química do sistema, etc. (EVANGELISTA, 1998; FLORENCE; ATWOOD, 1998; ARAGÓN et al., 2006; VALLET-REGÍ et al., 2007; FERNANDÉZ et al., 2009; FERNANDÉZ et al., 2010).

Segundo Wang et al. (2009), a reticulação (formação de ligações cruzadas) e a adição de plastificantes são formas que atuam no controle de liberação de fármacos mediante uma matriz polimérica. De acordo com o aumento do grau de reticulação, diminui o movimento das cadeias poliméricas e o volume livre, consequentemente, a taxa de difusão do fármaco. Entretanto os agentes plastificantes são capazes de interporem-se entre as cadeias poliméricas, diminuindo as interações intramoleculares de forma a aumentar o volume livre e a difusão do fármaco (MARTIN, 1993).

A liberação por erosão depende da degradação do sistema, que poderá dar-se devido a reações químicas, liberando o fármaco para o meio externo. Os sistemas de liberação por erosão que incluem processos físicos e ou químicos possuem a vantagem, sobre os outros sistemas, de dispensar intervenções cirúrgicas para sua remoção (EVANGELISTA, 1998).

Outro modo de liberação é por intumescimento, que ocorre à medida que o solvente entra em contato com o sistema, resultando na relaxação das cadeias poliméricas com expansão do volume, permitindo a difusão do fármaco (FUNG, 1997). Peppas (2001) cita, como exemplo, os polímeros hidroxipropilmetil celulose (HPMC) e poli(ácido acrílico).

Existem vários modelos que descrevem o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na liberação de um fármaco do sistema: em função de sua geometria (cilindro, esferas, filmes, gel, etc.); o modo de difusão (estático ou dinâmico); e as características da matriz do sistema (porosa ou densa) (BERWIG, 2006; LYRA et al., 2012).

Entre os principais modelos que descrevem a cinética da liberação de fármacos, *in vitro,* pelos sistemas destacam-se: Higuchi ($M_t/M_\infty = K_H T^{1/2}$) (HIGUCHI, 1963); Korsmeyer-Peppas ($M_t/M_\infty = Kt^n$) (KORSMEYER; PEPPAS, 1983); Peppas-

Sahlin ($M_t/M_\infty = K_1T^N + K_2t^{2n}$) (PEPPAS; SAHLIN, 1989) e Lindner e Lippold ($M_t/M_\infty = Kt^n + b$) (LINDNER; LIPPOLD, 1995). Essas expressões permitem comparar e quantificar a cinética de liberação de um fármaco a partir da sua matriz (ARAGÓN et al., 2006; FERNANDÉZ et al., 2009; FERNANDÉZ et al., 2010; ARAGÓN et al. 2012).

3.3 FÁRMACOS TESTE

3.3.1 Sulfato de Gentamicina

Os antibióticos são fármacos que inibem ou impedem a multiplicação de microrganismos patogênicos ou provocam sua destruição. O mecanismo de ação bacteriostático provoca a inibição do crescimento bacteriano, enquanto que o mecanismo bactericida provoca a morte das bactérias (GUIMARÃES et al., 2006).

O sulfato de gentamicina (Genta) é um dos antibióticos mais utilizados para aplicação local cuja eficiência do método tem sido relatada com sucesso nos tratamentos profiláticos pós-cirúrgicos (CHRISTIAN, et al., 1989; CALHOUN et al., 1993; NELSON, et al., 1993; OSTERMANN, et al., 1993; AZI et al., 2010).

O antibiótico sulfato de gentamicina foi isolado, pela primeira vez, em 1963, por Weinstein et al., a partir do produto da fermentação de duas espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Micromonospora: Micromonospora purpurea* e *Micromonospora echinospora* (ODEN et al., 1972).

Os componentes da gentamicina são pseudotrissacarídeos, contendo garosamina e purpurosamina ligadas por cadeias glicosídeas a 2-deoxiestreptamina (COOPER et al., 1971a; COOPER et al., 1971b). A figura 3 apresenta a fórmula estrutural do sulfato de gentamicina.

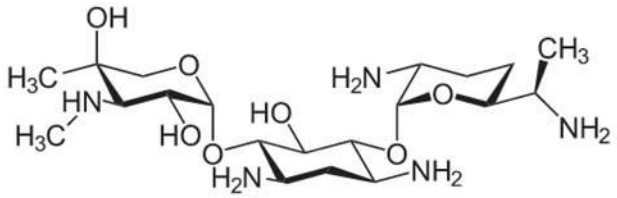


Figura 3. Fórmula estrutural do sulfato de gentamicina
Fonte: Henrifarma Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda

A gentamicina é apresentada na forma de sais de sulfato, um pó branco-perolado e higroscópico. Pertence à classe de antibióticos aminoglicosídeos, solúvel em água, moderadamente solúvel em metanol, etanol e acetona, e insolúvel em benzeno e hidrocarbonetos halogenados (CHANGEZ et al., 2003; CHAISRI et al., 2011).

Esse fármaco não é absorvido por via oral e é administrado por via intravenosa ou intramuscular. Em adultos, a dose recomendada é de 4 a 7 mg/kg/dia, uma vez ao dia, por 7 a 10 dias; e a dose máxima é de 15 mg/kg/dia para a via intravenosa (BRASIL, 2008). Para aplicação intramuscular, a dose administrada é de 1,5 mg/Kg, em que, cerca de uma hora após a administração, são atingidos os níveis séricos de aproximadamente 6 a 8 μg/ml. Níveis séricos superiores a 12 μg/ml devem ser monitorados. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) pode ser de 0,5 μg/ml, dependendo do microrganismo (TAVARES, 1996).

De acordo com o Drugbank (2014), a dose letal média (DL_{50}) em ratos, por via intravenosa, é de 52 mg/kg e, por via intravenosa, 96 mg/kg. A sua eliminação se dá por via renal (filtração glomerular), atingindo elevadas concentrações urinárias, sem sofrer alterações metabólicas (SOUSA, 2010).

A administração de gentamicina por longos períodos de tempo pode acarretar ao paciente ou usuário, além de sérios danos renais, perda auditiva permanente (incluindo surdez ou diminuição da audição) e problemas de equilíbrio. O risco aumenta de acordo com a dosagem (doses elevadas), o tempo de tratamento (uso prolongado do medicamento), também, tem relação com idades mais avançadas, histórico de doença renal pregressa e desidratação (TRABULSI; SOARES, 1998).

Sob tal perspectiva, novas tecnologias que permitam a administração do fármaco diretamente no sítio desejado são de fundamental interesse, pois reduziriam sua distribuição sistêmica e, consequentemente, minimizariam ou, mesmo, eliminariam os riscos decorrentes das administrações convencionais.

De acordo com Lima (2013), houve quase 19 mil internações no Brasil, no ano de 2011, com diagnóstico exclusivo de osteomielite, segundo informações do Ministério da Saúde. O aumento dos casos de osteomielite gera preocupação mundial, em especial, casos pós-traumáticos, decorrentes de fraturas graves ou pós-operatórias, pois constituem-se em fatores predisponentes à cronificação da doença.

O tratamento antimicrobiano, convencional, pode durar entre quatro e seis semanas, sendo que, no caso de tornar-se crônico, pode chegar a seis meses ou mais. Nessas situações, o tratamento é de alta complexidade, gerando altos custos tanto para o paciente quanto ao sistema de saúde.

Segundo Azi (2010, p.31) “o tratamento da infecção óssea é um grande desafio terapêutico e a estratégia mais frequentemente utilizada é uma combinação de desbridamento cirúrgico e uso de antibióticos”.

Em termos de efeitos tóxicos causados pelo uso de formulações de aplicação local à base de gentamicina, não foram encontrados relatos. Isso se deve ao fato, possivelmente, de a via de administração local possibilitar uma redução de efeitos adversos, pois, em oposição à via sistêmica (convencional), não utiliza a circulação sanguínea para transportar o fármaco até o local de ação. Entretanto o uso prolongado de elevadas quantidades ou o tratamento de áreas extensas pode resultar em absorção sistêmica suficiente para produzir efeitos colaterais, similares à administração convencional, sobretudo, nefrotoxicidade e ototoxicidade, considerando os rins e os ouvidos como os principais locais de acúmulo do antibiótico (TRABULSI; SOARES, 1998).

As concentrações terapêuticas de antimicrobianos suficientes para interromper a infecção dependem de fatores como a característica farmacológica do fármaco, dosagem e localização do agente patogênico no tecido ósseo, que podem ser alteradas pelas condições locais. Não é possível atingir concentrações terapêuticas se a infecção estiver localizada no interior de osso avascular, e altas dosagens de antibióticos, cerca de 10 a 100 vezes superiores às usuais, são necessárias para combater infecções quando as bactérias estiverem aderidas a biomateriais (GRISTINA; COSTERTON, 1985; NELSON, 2004). Dosagens muito altas podem causar efeitos colaterais indesejáveis, desde a toxicidade sistêmica até a resistência microbiana.

Conforme Zalavras (2004), a utilização de antimicrobianos, em região específica do organismo, permite alcançar concentrações terapêuticas no sítio desejado, com baixos níveis séricos e toxicidade sistêmica. Nesse sentido, os biomateriais à base de cimento α-TCP podem servir como veículo de antibióticos para liberação localizada, possibilitando a entrega do fármaco diretamente no sítio desejado. Sua constituição pastosa permite aplicação em diversas cavidades, sem a necessidade de dar forma ao local, inclusive, no osso avascular. No caso de cirurgias para a implantação de próteses, o cimento, carregado de fármaco, pode ser usado como um procedimento preventivo, tanto como suporte do implante, quanto recobrindo a superfície do material.

O sulfato de gentamicina é um dos antibióticos de escolha à incorporação em cimento acrílico, principalmente, devido ao seu amplo espectro, sua estabilidade em altas temperaturas e pH. Essa estabilidade faz dele o antibiótico de escolha para uso em cirurgia ortopédica, quando as altas temperaturas são necessárias para a constituição desses cimentos (COOMBES et al., 2006; AZI et al., 2010).

Azi et al. (2010) agregaram 480 mg de sulfato de gentamicina a 40 g de cimento acrílico e observaram a manutenção dos índices terapêuticos desejados do antibiótico até a segunda semana do seu estudo *in vitro*. Sugerindo, com isso, uma alternativa para viabilizar a expansão do uso do antibiótico local tanto no tratamento como na profilaxia da infecção óssea.

Os cimentos α-TCP carregados com sulfato de gentamicina podem constituir-se em meio promissor de liberação do antibiótico quando comparados à administração convencional, pois podem viabilizar a entrega do antibiótico em locais cujos métodos convencionais não sejam suficientes, como no osso avascular, além da vantagem de liberarem o fármaco, de forma restrita e suficiente, para tratar determinado sítio do organismo, assim, diminuindo sua biodisponibilidade no organismo como um todo e, consequentemente, minimizando os efeitos colaterais indesejados.

3.3.2 Anestésicos Locais

Grande parte dos estudos com sistemas de liberação de fármacos anestésicos locais envolvem veículos com formulações líquidas, com uma variedade de micro/nanoesferas e lipossomas, que são injetados na região tecidual desejada visando prolongar a analgesia ou o alívio álgico (ARAUÚJO, et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005; MELO et al., 2014).

Os anestésicos locais (AL) da classe amino-amida (cloridrato de lidocaína – Lido, cloridrato de bupivacaína – Bupi e cloridrato de levobupivacaína – Levo) são utilizados para inibição da percepção das sensações (sobretudo a dor) e também do movimento. A ação ocorre por meio do bloqueio reversível da condução nervosa. A interrupção da condução nervosa ocorre como consequência da inibição do processo excitação-condução, a partir do bloqueio do movimento de íons sódio para o interior da célula nervosa. Essa ação reversível pode se dar tanto em fibras

sensoriais quanto motoras (COVINO; VASSALO, 1985; GOODMAN; GILMAN, 1996; RANG et al., 2015).

A figura 4 representa a fórmula estrutural dos AL.

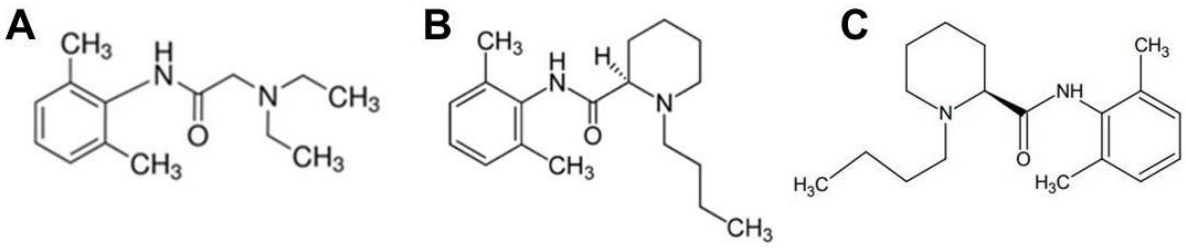


Figura 4. Fórmula estrutural dos anestésicos locais: A- cloridrato de lidocaína; B- cloridrato de bupivacaína; C- cloridrato de levobupivacaína
Fonte: Cristália produtos Químicos farmacêuticos Ltda

Segundo Edgcombe e Hocking (2013), as características da estrutura do anel aromático e o comprimento da cadeia de hidrocarbonetos determinam que a lipossolubilidade do anestésico local esteja diretamente relacionada com a sua potência. Os fármacos lipossolúveis têm maior facilidade de penetração na membrana celular para exercer seu efeito. “Quanto mais potente, menor a quantidade de droga necessária para ocasionar o mesmo efeito”, a bupivacaína, por exemplo, é aproximadamente quatro vezes mais potente que a lidocaína (EDGCOMBE; HOCKING, 2013). Deve-se atentar que os efeitos colaterais, também, estão relacionados com a taxa de ligação proteica, assim, a bupivacaína é mais tóxica que a lidocaína (EDGCOMBE; HOCKING, 2013). Contudo estudos com bupivacaína sugeriram que seus efeitos cardiotóxicos são, principalmente, causados pelo isômero destrobupivacaína [R(+) bupivacaína], já o isômero levobupivacaína [S(-) bupivacaína] apresentou menor efeito cardiotóxico (RANG et al., 2015).

A toxicidade é determinada de acordo com a dose aplicada e o grau de absorção sistêmica, ou seja, é proporcional à potência (KNUDSEN et al., 1997). Os principais efeitos tóxicos decorrem da absorção sistêmica, podendo ocorrer neurotoxicidade (Sistema Nervoso Central – SNC) e cardiotoxicidade (Sistema Cardiovascular – SC) (RANG et al., 2015). Agitação, tremores, redução do nível de consciência, convulsões e depressão respiratória constituem-se nos sinais e sintomas da neurotoxicidade que podem levar ao coma e, mesmo, à morte. Com relação à cardiotoxicidade, a sintomatologia é evidenciada por fibrilações e arritmias cardíacas (HORLOCKER; WEDEL, 2002; RANG et al., 2015). No caso da

bupivacaína, devido à alta taxa de ligação proteica, os efeitos cardíacos são de difícil tratamento (CANGIANI, 2007). Já a lidocaína, devido aos seus efeitos cardíacos antiarrítmicos, tem indicação de uso clínico em casos de pacientes acometidos por arritmias (EDGCOMBE; HOCKING, 2013).

De acordo com o *Drugbank* (2014), para a bupivacaína a DL_{50}, por via intravenosa e subcutânea em camundongos, é de 6 a 8 mg/kg e 38 a 54 mg/kg, respectivamente; para a levobupivacaína a DL_{50} em coelho é de 5,1 mg/kg por via intravenosa e 63 mg/kg em ratos, por via subcutânea; para a lidocaína a LD_{50} em ratos, subcutânea, é de 570 mg/kg e, intravenosa, de 21 mg/kg.

Os AL devem ser administrados em áreas próximas à região nervosa que se deseja o efeito anestésico (pele, tecido subcutâneo, espaços intratecal e epidural). Parte do fármaco será absorvida pela circulação sistêmica. A quantidade da biodisponibilidade sistêmica dependerá do fluxo sanguíneo da região onde foi administrado e dos efeitos que o fármaco pode desencadear na circulação local (EDGCOMBE; HOCKING, 2013). O metabolismo é hepático e é um processo lento, determinando meia-vida mais longa, por isso, pode apresentar efeito cumulativo em caso de doses repetidas. A eliminação dos AL ocorre por via renal (RANG et al., 2015; EDGCOMBE; HOCKING, 2013).

De acordo com o laboratório Cristália (fabricante dos anestésicos locais utilizados neste estudo), a dose de qualquer anestésico local difere de acordo com o procedimento anestésico, a área a ser anestesiada, a vascularização dos tecidos, o número de segmentos neuronais a serem bloqueados, a intensidade do bloqueio, o grau de relaxamento muscular necessário, a duração desejada da anestesia, a tolerância individual, e a condição física do paciente. O Cloridrato de lidocaína é indicado para produção de anestesia local ou regional, com doses variando entre 5 e 300 mg, de acordo com a necessidade da analgesia. Para bloqueio periférico dental é indicado o uso de 1 a 5 ml de Cloridrato de lidocaína a 2% com dose total de 20 a 100 mg. Para o Cloridrato de Bupivacaína a concentração injetável de 0,5% recomendada para infiltração e bloqueio nas áreas maxilar e mandibular, não deve exceder 90 mg de bupivacaína. Para o tratamento e profilaxia das dores causadas por processos cirúrgicos, raquianestesia e cirurgia abdominal o fabricante recomenda para uso injetável em adultos 2 a 4 ml (10 a 20 mg de bupivacaína) a

0,5% e 3 a 4 ml (15 a 20 mg do fármaco) para o Cloridrato de levobupivacaína também a 0,5%.

Wang et al. (2009) utilizaram, em sua pesquisa *in vivo*, um sistema bioabsorvível semelhante a uma massa de modelar, denominado *Xybrex*, carregado com o anestésico local lidocaína, que forneceu vários dias de analgesia em nervos periféricos de ratos, sem apresentar neurotoxicidade local ou toxicidade sistêmica.

Em um estudo controlado e randomizado em humanos, Marmur et al. (2010) injetaram hidroxiapatita carregada com lidocaína a 2% para correção de sulcos nasolabiais em pacientes, e os resultados apontaram diferenças significativas na redução da dor entre o grupo tratado com a pré-mistura de lidocaína à hidroxiapatita e o grupo controle, mas sem apresentar diferenças estéticas entre esses grupos.

Verrum et al. (2010) utilizaram uma matriz de cimento fosfato de cálcio deficiente em cálcio agregada de cloridrato de bupivacaína em diferentes percentis, definiram, *in vitro*, o perfil de liberação do fármaco e, posteriormente, avaliaram, *in vivo,* o desempenho sobre o controle da dor em cobaias, quando observaram a persistência da analgesia dose-dependente durante os primeiros dias pós-implante.

Assim, os anestésicos locais (AL), como lidocaína, bupivacaína e levobupivacaína, apresentam grande potencial de uso por meio de sistemas de liberação de fármacos. Tais sistemas possibilitariam substituir o tratamento convencional com opioides, que alteram o estado de consciência e causam dependência química (BOND et al., 2004).

Os AL podem ser utilizados tanto em pacientes que apresentam um quadro álgico causado por doenças como o câncer, a artrite reumatoide, as lesões neurológicas, entre outras, como em cirurgias ortopédicas e odontológicas, minimizando ou, mesmo, eliminando o quadro álgico, contribuindo para o sucesso do tratamento da doença e melhorando a qualidade de vida do indivíduo (SIDDALL; COUSINS, 1995). Tais sistemas auxiliam no tratamento da dor aguda e crônica, prolongando o tempo de ação do fármaco no local desejado, visto que, na administração convencional, a ação desses anestésicos é limitada pelo curto tempo de ação (2 a 4 horas) (WHITESIDE; WILDSMITH, 2001).

Conforme Bond et al. (2004), em teoria, a obtenção de níveis locais elevados de anestésicos contribuiria para a redução do quadro álgico de pacientes submetidos a procedimentos ortopédicos invasivos. Essa combinação de cimento

com anestésicos traria muitas vantagens ao paciente, como a redução dos níveis sistêmicos de fármacos opioides e analgésicos, maior adesão ao processo de reabilitação nos primeiros dias do pós-cirúrgico, mobilização precoce (importante na recuperação de pacientes idosos), ou seja, contribuiria com o sucesso, tanto do procedimento operatório quanto do processo de recuperação do paciente (GIORDANO et al., 2007).

De acordo com Araújo (2003; 2005), é um desafio importante instituir novos métodos de tratamento a fim de produzir analgesia com maior tempo de ação, menor toxicidade local ou sistêmica e melhor seletividade de bloqueio sensorial (DE JONG, 1994) no sentido de minimizar ou mesmo eliminar a dor.

3.4 VIGILÂNCIA E REGULAÇÃO SANITÁRIA

A Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990, define vigilância sanitária como:

> Conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo:
>
> I - o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo;
>
> II - o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde.

De acordo com esse conceito, a vigilância sanitária é uma prática capaz de interferir nos fatores determinantes do processo saúde-doença, pois suas ações visam eliminar, diminuir ou prevenir riscos provenientes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde. O exercício prático dá-se por meio da prestação de serviços nos processos inerentes à anuência, fiscalização, observação, licenciamento, julgamento de irregularidades e aplicação de penalidades, funções decorrentes do poder de polícia. Permeiam estes processos as funções normativa e educativa, as quais representam um importante passo no desenvolvimento de uma consciência sanitária em defesa do direito do consumidor, da cidadania e segurança do paciente. Estas práticas desempenham um papel ativo na modificação das condições de saúde da população (FONSECA, 2011).

A regulação possibilita o desempenho da função do Estado de organizar a vida em sociedade, necessária para o cumprimento dos diversos deveres, possibilitando a consecução dos objetivos coletivos pactuados pelo corpo social (AITH, 2007). Segundo Marques Neto (2005) a regulação “[...] é característica de um certo modelo econômico, aquele em que o Estado não assume diretamente o exercício de atividade empresarial, mas intervém enfaticamente no mercado utilizando instrumentos de autoridade”. É composta por diversos instrumentos por meio dos quais os governos estabelecem exigências às empresas e aos cidadãos.

Tais instrumentos, referidos no "Relatório sobre a Reforma Regulatória: Brasil", incluem leis, pedidos formais e informais e normas subordinadas emitidas por todos os níveis de governo e normas emitidas por organismos não governamentais ou autorreguladores a quem os governos delegaram poderes normativos (BRASIL, 2008).

Especificamente, no campo da vigilância sanitária, a regulação pode ser entendida como uma forma de intervenção salutar, dessa maneira, visando impedir que determinados comportamentos no sistema de produção e consumo de bens e serviços causem prováveis ou iminentes danos ou riscos à saúde da população. A regulação sanitária exerce o papel de regulamentar, monitorar, controlar e fiscalizar as relações de produção e consumo de bens e serviços relacionados à saúde (SILVA, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é responsável pela regulação e vigilância sanitária de produtos para saúde, medicamentos, etc., e, de forma complementar, as vigilâncias sanitárias dos estados, Distrito Federal e municípios, em conformidade ao princípio da descentralização da saúde, previsto na Lei Orgânica da Saúde (Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990) (BRASIL, 2014).

Autarquia sob regime especial e vinculada ao Ministério da Saúde, a Anvisa foi criada pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, integrada ao Sistema Único de Saúde (SUS) e responsável pela coordenação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS)[1] é, atualmente, a maior agência reguladora brasileira, sendo a primeira que surgiu no campo social. Suas metas de desempenho são acordadas com o Ministério da Saúde e reguladas por meio de Contrato de Gestão. Está presente em todos os estados brasileiros e Distrito Federal e possui aproximadamente 80 postos distribuídos em pontos de entrada e saída, como portos, aeroportos e fronteiras terrestres, conhecidos como Postos de Vigilância Sanitária de Portos, Aeroportos, Fronteiras e Recintos Alfandegados da Anvisa (PAF/Anvisa) (ANVISA, 2014).

A missão da Anvisa (2014) é:

[1] O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária definido pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, pode ser entendido como um instrumento que o SUS dispõe para realizar seu objetivo de prevenção e promoção da saúde, por meio das atividades de regulação, normatização, controle e fiscalização na área de vigilância sanitária. Engloba os três níveis de governo: federal, estadual distrital e municipal.

> Promover e proteger a saúde da população e intervir nos riscos decorrentes da produção e do uso de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária, em ação coordenada com os estados, os municípios e o Distrito Federal, de acordo com os princípios do Sistema Único de Saúde, para a melhoria da qualidade de vida da população brasileira.

No que tange aos produtos destinados ao consumo/uso pela população brasileira, a Anvisa realiza a regulação nas fases de pré-comercialização e pós-comercialização, sendo que muitas das atividades realizadas nessas fases são estrategicamente centralizadas na agência. Exemplos de atividades realizadas na primeira fase, antecedendo a liberação do produto para a venda no mercado interno, incluem o registro dos produtos, a inspeção sanitária à empresa para verificar as Boas Práticas de Fabricação destes e a liberação de importação. A fase de pós-comercialização compreende ações de vigilância, monitoramento e fiscalização que decorrem durante a permanência dos produtos no mercado nacional, tendo como principal objetivo a minimização de danos à saúde decorrentes de seu uso (Brasil, 2014).

Com relação ao mercado interno no que tange aos equipamentos e produtos à saúde, o Brasil, oferece um potencial de crescimento para os próximos cinco anos (55,5 %), à frente da Índia (52,4 %) e Estados Unidos (34,9 %), ficando atrás apenas da China (65,7 %) (BRASIL, 2014). Portanto, as ações de fiscalização de produtos importados realizadas pela Anvisa ganham uma dimensão importante que objetiva, sobretudo, diminuir riscos e prevenir possíveis danos à saúde da população brasileira resultantes do uso de produtos. Tais ações são realizadas em todo país, por meio dos Postos de Vigilância Sanitária de Portos, Aeroportos, Recintos Alfandegados e Fronteiras (PVPAF) da Anvisa localizados nos estados, e exigem um espectro ampliado de conhecimento que abarca muitas áreas de formação, como enfermagem, farmácia, medicina e engenharia.

A título ilustrativo, para demonstrar a necessidade de amplo conhecimento técnico-científico nas ações conduzidas nos PVPAF, toma-se, aqui, o exemplo que segue: para que um biomaterial seja importado e disponibilizado ao uso no mercado nacional, é preciso, primeiramente, que seu registro seja aprovado pela Anvisa, conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 185, de 22 de outubro de 2001. Ademais, a empresa encarregada de fornecer este produto deve cumprir com as exigências estabelecidas na RDC nº 59, de 27 de junho de 2000, sobre "Boas

Práticas de Fabricação de Produtos Médicos", bem como atentar para a RDC nº 56, de 06 de abril de 2001, que dispõe sobre os requisitos para a comprovação da segurança e eficácia dos produtos para saúde. Tais normas servem de bases para a aplicação da RDC nº 81, de 5 de novembro de 2008, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Bens e Produtos Importados para fins de vigilância sanitária, cuja execução-fim da atividade fiscalizatória cabe aos PVPAF/Anvisa.

Os servidores-fiscais da Anvisa lotados nos PVPAF são responsáveis pela aplicação do exercício fiscalizatório, que se dá por meio da atribuição do “poder de polícia” (COLPO et al., 2013), regulamentado pela RDC nº 01, de 06 de dezembro de 2002. Em seu artigo 3º, determina as atribuições e prerrogativas desses fiscais, dessa maneira, dando livre acesso aos locais onde se processem, em qualquer fase, a prestação de serviço, a produção, a industrialização, o comércio, a distribuição, o armazenamento, a importação, a exportação de produtos, a coleta de amostras para análises de controle fiscal, as inspeções rotineiras e vistorias para apuração de eventos que tornem os produtos ou serviços passíveis de alteração, bem como a existência de risco sanitário e a verificação das condições de saúde e higiene, entre outros (BRASIL, 2002; BRASIL, 2012).

Além da necessidade de domínio de diversas áreas do conhecimento exigido em função das peculiaridades do conjunto de normas utilizado na sua tarefa fiscalizatória, os profissionais que atuam nos PVPAF/Anvisa, também, precisam estar atentos ao surgimento de novas tecnologias. A aquisição de conhecimentos na prática biotecnológica facilita a aplicação regulatória. Sob tal perspectiva, capacitações que estimulem estudos técnicos ligados à prática experimental podem permitir o acesso seguro da população às novas tecnologias a partir da incorporação do conhecimento envolvidos em seu desenvolvimento. Isso facilitaria aprimorar as práticas sanitárias e, também, estabelecer análises críticas sobre a aplicabilidade e abrangência à luz das regulamentações internacionais vigentes, refletindo, de forma mais efetiva, no exercício fiscalizatório mediante regulação de tais tecnologias, colaborando com o fortalecimento do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária.

De acordo Chiarini e Vieira (2012), o progresso tecnológico é essencial para o desenvolvimento econômico, cujo conhecimento científico-tecnológico é sua maior particularidade. Este, por sua vez, deve ser efetivamente fomentado por agentes públicos em prol de uma política pró-desenvolvimento. É um processo de

desenvolvimento dinâmico resultante da interação de diferentes agentes econômicos.

> Um desses agentes é a universidade, entendida aqui como uma instituição cujo papel social vai além de formar uma sociedade mais "iluminada", mas é responsável pelo processo de criação e disseminação, tanto de novos conhecimentos quanto de novas tecnologias, através de pesquisa básica, pesquisa aplicada, desenvolvimento e engenharia e pode ser encarada como agente estratégico para o catch-up. (CHIARINI; VIEIRA, 2012)

De acordo com Siegel (2012), agências reguladoras como a "Food and Drug Administration" (FDA) estão dando cada vez mais ênfase à "qualidade do projeto", pois compreender seus mecanismos pode contribuir para a identificação de falhas (controle da qualidade), bem como para o processo de propriedade intelectual e garantia dessa qualidade.

A Anvisa, por meio do programa de pós-graduação regulamentado pela Portaria n° 1.974/GGPES/ANVISA, de dezembro de 2014, vem fomentando a capacitação nas áreas de conhecimento que identifica como de interesse a vigilância sanitária. Esse é um passo inicial e importante para a ampliação do conhecimento, porém deve-se levar em conta que os núcleos formadores ou universidades possuem especificidades ou áreas de conhecimentos tão distintas entre elas quanto suas localizações no território nacional.

Nesse sentido, os servidores-fiscais dos PVPAF, por estarem lotados em todas as regiões do país, têm acesso facilitado às mais distintas áreas de formação e pós-formação universitária de acordo com os nichos de *expertises* inerentes a cada universidade. Tais conhecimentos e habilidades adquiridos poderão ser organizados, pela agência, na construção de uma rede de conhecimentos sanitários que, somados – com ajuda das tecnologias de comunicação e informação –, poderão fortalecer as mais distintas áreas de atuação da Anvisa, os PVPAF e, consequentemente, o SNVS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a formação desta tese, inicialmente, foi elaborado um projeto, este submetido à apreciação do Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos, responsável pelo Laboratório de Biomateriais da UFRGS.

O projeto inicial propôs-se a testar a pergunta estruturada: “É possível desenvolver tecnologias, com maior resistência mecânica, à base de cimento alfa-fosfato de tricálcio que permitam a liberação controlada dos fármacos sulfato de gentamicina e cloridratos de lidocaína, bupivacaína e levobupivacaína?”

A revisão sistemática de literatura aconteceu durante todo o período do estudo, desde a construção do projeto inicial até a finalização desta tese.

4.1 BASES DE DADOS E ESTRATÉGIA DE BUSCA

Uma vez estabelecida a pergunta, realizou-se a busca de literatura atinente ao tema por meio dos descritores “calcium phosphate cement”, “alpha tricalcium phosphate cement”, “calcium-deficient hydroxyapatite”, “α-TCP”, “alpha tricalcium phosphate cement double-setting”, “calcium phosphate cement AND hydrogel”, “calcium phosphate cement AND acrylamide”, “alpha tricalcium phosphate cement AND drug release”, “alpha tricalcium phosphate cement AND drug-release system”, “alpha tricalcium phosphate cement AND gentamicin sulfate”, “alpha tricalcium phosphate cement AND lidocaine hydrochloride”, “alpha tricalcium phosphate cement AND bupivacaine hydrochloride”, “tricalcium phosphate cement AND levobupivacaine hydrochloride”. Também se buscou todas as variáveis acima com os descritores: “AND hydrogel” e “AND acrylamide”. As bases de dados consultadas foram, Portal de Periódicos da Capes (via sistema de bibliotecas/ UFRGS), Embase, Bireme, Google acadêmico, banco de dissertações e teses da Capes e regulamentações da Anvisa/Ministério da Saúde.

4.1.1 Critérios de seleção e exclusão de publicações

Incluíram-se todas as publicações obtidas após leitura dos resumos que apresentaram temática de interesse ao estudo. Não foi aplicado critério de exclusão com relação à linguagem e ao ano de publicação do estudo.

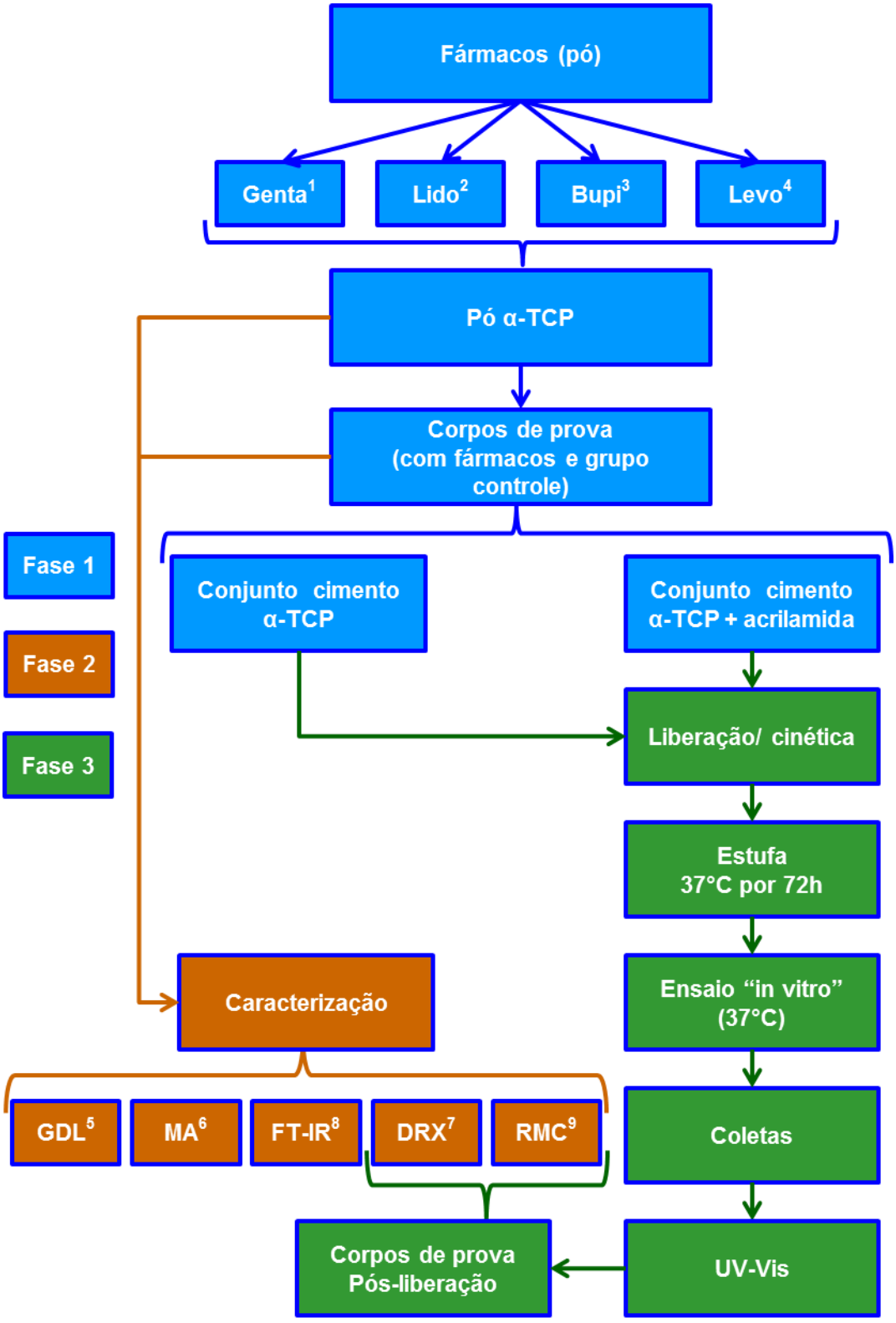
4.1.2 Publicações selecionadas

Foram localizados 2.056 estudos nas bases de dados descritas no tópico precedente.

Após remoção de duplicadas, restou um montante de 1.631 publicações para a leitura de título e resumo. Dessas, então, 812 foram selecionadas para leitura completa e 217 foram incluídas no referencial bibliográfico.

4.2 DESENHO DO ESTUDO *IN VITRO*

Para atingir o objetivo proposto, este estudo foi realizado em três fases principais (Figura 5). Primeiramente, foram determinadas as formulações para a obtenção dos dois conjuntos de corpos de prova (cimento α-TCP e cimento α-TCP de dupla pega), constituídos a partir de misturas do pó de α-TCP e dos pós dos fármacos: sulfato de gentamicina (Genta), cloridratos de: lidocaína (Lido), bupivacaína (Bupi) e levobupivacaína (Levo). Também, foram elaborados corpos de prova isentos de fármacos – grupo controle (Controle). Em seguida, amostras do pó de α-TCP e dos dois conjuntos de cimentos (α-TCP e α-TCP de dupla pega com e sem a adição dos fármacos testados) foram caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas, morfológicas e mecânicas. Na fase final, os conjuntos foram avaliados quanto à viabilidade de servirem como sistema de liberação de fármacos (cinética de liberação).



[1]Sulfato de gentamicina; [2]Cloridrato de lidocaína; [3]Cloridrato de bupivacaína; [4]Cloridrato de Levobupivacaína; [5]Granulometria por difração a laser; [6]Método de Arquimedes; [7]Difração de raios X; [8]Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier; [9]Resistência mecânica a compressão axial

Figura 5. Desenho esquemático da metodologia desenvolvida
Fonte: elaboração própria.

4.3 PREPARO DAS PASTAS CIMENTÍCIAS

O cimento α-TCP foi preparado segundo descrito na literatura (DRIESSENS et al., 1997), por meio da reação: $CaCO_3+Ca_2P_2O_7 \rightarrow \alpha\text{-}Ca_3(PO_4)_2 + CO_2$

A partir da calcinação do hidrogenofosfato de cálcio di-hidratado (DCPD), à temperatura de 550ºC por 5 horas, em forno de mufla (SANCHIS), foi obtido o γ-pirofosfato de cálcio (γ-CPP). Em seguida, foram misturados a seco, por 20 minutos, o γ-CPP ($Ca_2P_2O_7$) e o carbonato de cálcio ($CaCO_3$) em proporção equimolar. Durante 3 horas essa mistura foi calcinada, em forno elétrico (MAITEC I 4500 W), a 1.500°C em cadinho de alumina (Al_2O_3), sendo então resfriada e vertida sob temperatura ambiente (Monma et al., 1984), obtendo-se o α-TCP.

Após o resfriamento, o material foi desagregado manualmente em almofariz de porcelana e moído em meio alcoólico, utilizando-se álcool etílico (CH_3CH_2OH) na proporção líquido/pó 2:1, por 8 horas em um frasco polimérico, contendo corpos esféricos de alumina. A suspensão resultante (pó mais álcool) foi vertida em béquer e colocada em estufa a 70ºC até evaporação do álcool, restando apenas o pó de cimento α-fosfato tricálcico.

O cimento α-TCP de dupla pega foi obtido de acordo com os dados descritos na tabela 1 a seguir (SANTOS, 2002; SANTOS et al., 2005). A relação líquido-pó utilizada foi de 0,3 ml/g.

Tabela 1. Composição para a constituição do cimento α-TCP de dupla pega

Fase sólida	Fase líquida
• 100% pó α-TCP; • 0,01% persulfato de amônio	• 10% acrilamida; • 0,5% N,N'-metilenobisacrilamida; • 2,5% Na_2HPO_4; • 1% poliacrilato de amônia.

4.4 FASE 1: ELABORAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Os corpos de prova contendo os fármacos estudados, foram elaborados considerando, para o antibiótico sulfato de gentamicina, a dose máxima de administração intravenosa (15 mg/Kg/dia) e a MIC (0,5 μg/ml), portanto cada amostra foi composta por aproximadamente 15 mg do fármaco. Para as amostras contendo os AL, levou-se em conta a quantidade média suficiente para efeito analgésico, optando-se por elaborar corpos de prova contendo, separadamente, 40 mg de cloridrato de lidocaína e bupivacaína e 35 mg de levobupivacaína. Os fármacos (pó) foram incorporados ao pó de α-TCP, na fase sólida, por meio da mistura mecânica de pós (ESPANOL et. al., 2009).

Foram elaborados dois conjuntos de corpos de prova, sendo um constituído por cimento α-TCP (a partir de agora denominado, apenas, α-TCP) e outro conjunto constituído por cimento α-TCP de dupla pega (a partir de agora denominado, apenas, por α-TCP DP). No primeiro conjunto, a fase líquida foi composta por Na_2HPO_4 a 2,5%, como acelerador de pega, respeitando a relação líquido-pó de 0,3 ml/g. Já no segundo conjunto, com o sistema hidrogel (acrilamida e poliacrilato de amônia), os corpos de prova foram preparados de acordo com a tabela 1. Para os dois conjuntos, também, foram produzidos corpos de prova isentos de fármacos referentes ao grupo comparação (controle).

O molde de conformação dos corpos de prova foi confeccionado em polipropileno contendo cavidades de 6 mm (± 0,1 mm) de diâmetro por 12 mm (± 0,1 mm) de comprimento, em conformidade a norma ASTM F 451-95 (*Standard specification for acrylic bone cement*).

Os corpos de prova foram desmoldados 10 minutos após a moldagem e submetidos a 100% de umidade em estufa a 37ºC por 48 horas e à secagem em estufa a 37ºC por 72 horas.

Os corpos de prova, que compuseram os dois conjuntos, foram classificados em 10 grupos de acordo com o fármaco presente em cada amostra e o tipo de cimento (com e sem o hidrogel), conforme denominação que segue:

- α-TCP Controle (cimento α-TCP isento de fármacos);
- α-TCP DP Controle (cimento α-TCP DP isento de fármacos);
- α-TCP Genta (cimento α-TCP + sulfato de gentamicina);

- α-TCP DP Genta (cimento α-TCP DP + sulfato de gentamicina);
- α-TCP Lido (cimento α-TCP + cloridrato de lidocaína);
- α-TCP DP Lido (cimento α-TCP DP + cloridrato de lidocaína);
- α-TCP Bupi (cimento α-TCP + cloridrato de bupivacaína);
- α-TCP DP Bupi (cimento α-TCP DP + cloridrato de bupivacaína);
- α-TCP Levo (cimento α-TCP + cloridrato de levobupivacaína);
- α-TCP DP Levo (cimento α-TCP DP + cloridrato de levobupivacaína).

4.5 FASE 2: CARACTERIZAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

A caracterização, no que coube, envolveu dois momentos experimentais, um que antecedeu o início da Fase 3 (Pré-teste) e outro *a posteriori* (Pós-teste). Esses dois momentos constituíram dois subconjuntos Pré e Pós-testes, tanto para o conjunto α-TCP quanto ao conjunto α-TCP DP. Cada subconjunto foi composto pelos 10 grupos amostrais, análogo ao apresentado no item 4.1.1, conforme nomenclatura abaixo:

- Pré-Controle (cimento α-TCP isento de fármacos);
- Pré-DP Controle (cimento α-TCP DP isento de fármacos);
- Pré-Genta (cimento α-TCP + sulfato de gentamicina);
- Pré-DP Genta (cimento α-TCP DP + sulfato de gentamicina);
- Pré-Lido (cimento α-TCP + cloridrato de lidocaína);
- Pré-DP Lido (cimento α-TCP DP + cloridrato de lidocaína);
- Pré-Bupi (cimento α-TCP + cloridrato de bupivacaína);
- Pré-DP Bupi (cimento α-TCP DP + cloridrato de bupivacaína);
- Pré-Levo (cimento α-TCP + cloridrato de levobupivacaína);
- Pré-DP Levo (cimento α-TCP DP + cloridrato de levobupivacaína);
- Pós-Controle (cimento α-TCP isento de fármacos);
- Pós-DP Controle (cimento α-TCP DP isento de fármacos);
- Pós-Genta (cimento α-TCP + sulfato de gentamicina);
- Pós-DP Genta (cimento α-TCP DP + sulfato de gentamicina);
- Pós-Lido (cimento α-TCP + cloridrato de lidocaína);
- Pós-DP Lido (cimento α-TCP DP + cloridrato de lidocaína);

- Pós-Bupi (cimento α-TCP + cloridrato de bupivacaína);
- Pós-DP Bupi (cimento α-TCP DP + cloridrato de bupivacaína);
- Pós-Levo (cimento α-TCP + cloridrato de levobupivacaína);
- Pós-DP Levo (cimento α-TCP DP + cloridrato de levobupivacaína).

A figura 6 ilustra a nomenclatura adotada para as amostras estudadas.

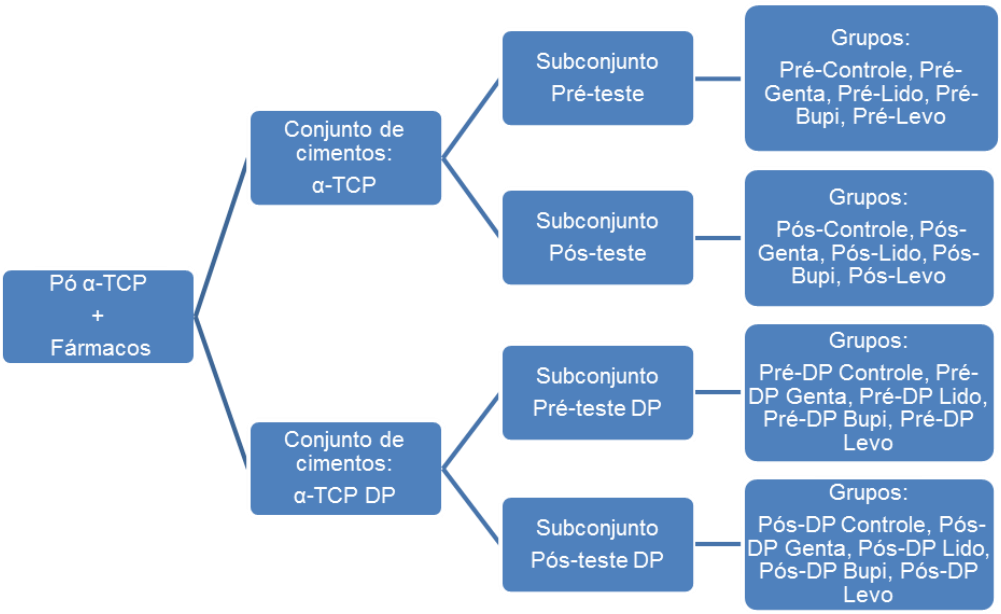


Figura 6. Nomenclatura das amostras utilizadas no estudo
Fonte: elaboração própria

Os grupos amostrais que integraram os dois conjuntos de cimentos (α-TCP e α-TCP DP), bem como seus respectivos subconjuntos (quando coube), foram caracterizados quanto às propriedades estruturais, mecânicas e morfológicas por:

- Granulometria por difração a *laser* (GDL).
- Identificação de fases cristalinas por difração de raios X (DRX).
- Identificação de grupamentos químicos por Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).
- Microestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Pelo método de Arquimedes: Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente, Absorção de Líquido (MA).
- Análise quantitativa e de tamanho de poros por imagens.
- Resistência mecânica à compressão axial (RMC).

4.5.1 Número Amostral

Neste estudo utilizou-se o total de 200 amostras (N= 200), distribuídas de acordo com os ensaios apresentados na tabela 2. As amostras utilizadas nos ensaios de DRX, FT-IR e MEV eram provenientes dos experimentos de RMC, já que se tratam de ensaios destrutivos.

Tabela 2. Número de amostras em função dos ensaios, considerando os grupos, subconjuntos e conjuntos estudados

Conjunto	Subconjunto	Grupo	Número de amostras (n) Ensaio					
			DRX[1]	FT-IR[2]	MEV[3]	MA[4]	RMC[5]	Liberação *in vitro*[6]
α-TCP	Pré-teste α-TCP	α-TCP Controle	1	1	1	5	10	3
		α-TCP Genta	1	1	1	5	10	3
		α-TCP Lido	1	1	1	5	10	3
		α-TCP Bupi	1	1	1	5	10	3
		α-TCP Levo	1	1	1	5	10	3
	Pós-teste α-TCP	α-TCP Controle	1	1	1	-	5	-
		α-TCP Genta	1	1	1	-	5	-
		α-TCP Lido	1	1	1	-	5	-
		α-TCP Bupi	1	1	1	-	5	-
		α-TCP Levo	1	1	1	-	5	-
α-TCP DP	Pré-teste α-TCP DP	α-TCP DP Controle	1	1	1	5	10	3
		α-TCP DP Genta	1	1	1	5	10	3
		α-TCP DP Lido	1	1	1	5	10	3
		α-TCP DP Bupi	1	1	1	5	10	3
		α-TCP DP Levo	1	1	1	5	10	3
	Pós-teste α-TCP DP	α-TCP DP Controle	1	1	1	-	5	-
		α-TCP DP Genta	1	1	1	-	5	-
		α-TCP DP Lido	1	1	1	-	5	-
		α-TCP DP Bupi	1	1	1	-	5	-
		α-TCP DP Levo	1	1	1	-	5	-

[1]Difração de raios X; [2]Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier; [3]Microscopia Eletrônica de Varredura; [4]Método de Arquimedes; [5]Resistência mecânica a compressão axial; [6]Ensaio de Liberação *in vitro* (triplicata)

4.5.2 Granulometria por difração a *laser*

A técnica calculou o tamanho de partículas do pó de cimento α-TCP anterior a reação de pega, de acordo com a difração do *laser* quando uma partícula o atravessa. O tamanho e a distribuição das partículas foram determinados por meio de um granulômetro CILAS®, modelo 1180, com faixa de detecção de 0,04 a 2500 µm. O método selecionado foi a úmido. O fluido escolhido para a análise foi o álcool isopropílico, como suspensor. Para dispersão das partículas foi utilizado ultrassom por 60 segundos. A fim de garantir a dispersão das partículas, a suspensão foi submetida ao ultrassom por 60 segundos.

4.5.3 Difração de raios X (DRX)

A composição de fases dos pós obtidos, tanto após a calcinação quanto após a elaboração dos corpos de prova constituídos pelos fármacos e hidrogel, foi analisada por difração de raios X por meio de um difratômetro da marca Phillips®, modelo X'Pert MPD com tubo de cobre (radiação CuKα, filtro de Ni). Para a análise qualitativa foi adotado o intervalo angular de varredura entre 10º e 50º, com um incremento de 0,05º, em um tempo de 3 segundos/passo. A tensão e a corrente utilizadas no tubo foram de 40 KV e 40 mA, respectivamente, para a obtenção dos difratogramas. O *software* utilizado para a análise foi o X'Pert High Score (do próprio equipamento), comparando-se os resultados com as fichas do alfa-TCP (009-0348), beta-TCP (009-0169), HA (009-0432) e CDHA (0046-0905) fornecidas pelo *International Center for Diffraction Data* (ICDD). Este estudo foi aplicado aos subconjuntos Pré e Pós-testes.

4.5.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A análise de grupamentos químicos foi realizada por meio de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier em um espectrômetro Spectrum 1000. As amostras foram preparadas conforme ASTM E 1252 e analisadas numa faixa de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}. Para tanto, fez-se necessária à confecção de uma pastilha envolvendo o pó em questão e uma porcentagem de brometo de potássio (KBr) de grau espectroscópico na proporção de 0,3 mg pó para 300 mg de KBr. Este estudo foi aplicado apenas ao subconjunto Pré-teste.

4.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos filmes obtidos foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em equipamento da marca JEOL - JSM 6060, do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 10 kV a 15 kV. Antes do exame, as amostras foram cobertas com fina camada de ouro por *sputttering*. Este estudo foi aplicado aos subconjuntos Pré e Pós-testes.

4.5.6 Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente, Absorção de líquido pelo Método de Arquimedes (MA)

O procedimento para o cálculo da densidade, porosidade e absorção de líquido baseou-se no Princípio de Arquimedes, por meio da determinação da massa da amostra seca, úmida e imersa, obedecendo à norma internacional ASTM C 20 (*Standard test methods for apparent porosity, water absorption, apparent specific gravity, and bulk density of burned refractory brick and shapes by boiling water*). Este estudo foi aplicado apenas ao subconjunto Pré-teste.

O querosene (Solv-raz®) foi utilizado como líquido de flotação (ALVES, 2005), pois as amostras apresentavam alto grau de porosidade e o querosene, além de evitar reações no cimento (conforme recomenda a norma aplicada), não constituía solvente eficiente aos fármacos utilizados no estudo.

Para a realização da pesagem das amostras imersas e úmidas, foi necessário que os corpos de prova permanecessem imersos em querosene por 24 horas, a uma temperatura de 37ºC (± 1 °C) e com relação volumétrica líquido/sólido igual a 50 (SANTOS 2002). A pesagem das amostras secas foi realizada antes da imersão destas em querosene.

A Densidade Aparente (DA) corresponde à relação entre a massa de uma amostra e a massa do volume do líquido total de uma determinada amostra, incluindo a porosidade. Pode ser calculada aplicando-se a equação 1.

Equação 1. Densidade Aparente

$$DA = \left(\frac{Ps}{Pu - Pi}\right).pl$$

Onde, *DA* é a densidade aparente (g/cm^3); *Ps*, o peso seco (g); *pl*, a densidade do meio líquido (querosene = 80); *Pu*, o peso úmido (g); *Pi*, o peso imerso (g).

Para calcular o percentual da Porosidade Total (Pt), utilizou-se o método geométrico, ou seja, os corpos de prova foram pesados em balança e suas dimensões medidas por meio de um paquímetro. Foi utilizado o valor da densidade aparente (DA) dividido pela densidade real (DR) do cimento α-TCP, cujo valor é 3,156 g/cm^3 (MOREJÓN-ALONSO et al., 2015), exposto na equação 2.

Equação 2. Porosidade Total

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

Onde, *P* é a porosidade total (%); *DA* é a densidade aparente (g/cm^3); *DR,* a densidade real do cimento α-TCP= 3,156 g/cm^3.

A Porosidade Aparente (PA) é dada pelo percentual do volume da porosidade aberta existente em uma determinada amostra. Ou seja, é a razão entre o volume de poros abertos e o volume da amostra, conforme equação 3.

Equação 3. Porosidade Aparente

$$PA = \left(\frac{Pu - Ps}{Pu - Pi}\right).100$$

Onde, PA é a porosidade aparente (%); *Pu*, o peso úmido (g); *Ps*, o peso seco (g); *Pi* é o peso imerso (g).

A Absorção de Líquido é dada pela massa percentual adquirida pela amostra em contato com um meio líquido quando absorve o máximo desse líquido. É determinada por meio da medição do peso seco e peso úmido, após mergulhar a amostra, por determinado período, no meio líquido. O cálculo se dá através da equação 4.

Equação 4. Absorção de Líquido

$$AbL = \left(\frac{Pu - Ps}{Ps}\right).100$$

Onde, *AbL* é a Absorção de Líquido (%); *Pu*, o peso úmido (g); *Ps*, o peso seco (g).

4.5.7 Análise quantitativa e mensuração de tamanho de poros por imagens

A análise quantitativa e de tamanho de poros foi realizada nas imagens obtidas por meio do MEV, a partir do *software* livre *ImageJ*. Foi utilizada uma amostra de cada grupo que constituiu os subconjuntos Pré e Pós-testes.

A superfície de cada corpo de prova foi lixada com diferentes granulometrias de lixas, começando com lixa 100 e após lixas: 220, 320, 400, 600 e 1200. As amostras foram cobertas com fina camada de ouro por *sputttering* e micrografadas em MEV utilizando tensão de aceleração de 15 kV com aumento de 50x.

Cada imagem foi analisada 30 vezes a fim de se detectar possíveis distorções quantitativas, as quais não foram encontradas.

4.5.8 Resistência Mecânica à Compressão Axial (RMC)

A resistência mecânica à compressão foi medida em máquina universal de ensaios da marca Instron® modelo 3369. As amostras foram comprimidas com taxa de deformação de 1,0 mm/min utilizando-se a célula de carga de 2 kN. Os corpos de prova não ficaram imersos em solução a fim de evitar a liberação dos fármacos. Portanto, após a desmoldagem, foram submetidos a um ambiente úmido (100% de umidade relativa) em estufa a 37ºC por 72 horas. Este estudo foi aplicado aos subconjuntos Pré e Pós-testes.

Com o ensaio de resistência mecânica, pôde-se determinar a carga máxima necessária para o cálculo da resistência mecânica dos corpos de prova. A resistência mecânica à compressão é dada pela tensão de ruptura última do corpo de prova, que é dependente da força atuante na área efetiva da seção reta do corpo de prova. A resistência mecânica à compressão foi calculada de acordo com a equação 5, ne sequência, expressa:

Equação 5

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

Onde σ é a tensão de ruptura (MPa); *F* é a força (N) necessária para a fratura e *A* é a área da seção reta do corpo de prova (mm^2).

Para a determinação da resistência mecânica à compressão axial para o subconjunto Pré-teste, foram selecionados, de forma aleatória, a partir de uma população de 30 amostras (N=30), 10 corpos de prova (n=10) que representaram os grupos que integram os subconjuntos Pré-testes (com e isentos do hidrogel). Os subconjuntos Pós-testes foram compostos por cinco (n=5) corpos de prova para cada grupo.

Vale esclarecer que, para os subconjuntos Pré-testes, optou-se por não utilizar a população integral de amostras a fim de minimizar os efeitos estatísticos que poderiam ser gerados quanto à diferença relacionada ao número de amostras (n=5) de cada grupo que formou os subconjuntos de cimentos Pós-testes.

4.5.9 Erros de Medidas

Nesse estudo, o erro das medidas de massa está em função da imprecisão da balança analítica utilizada, cuja incerteza é de ± 0,0001 g, ou seja, todas as medidas de massa apresentam um erro na ordem de 0,01%. Para as medidas métricas, o erro está em função da imprecisão do paquímetro, com incerteza de ± 0,02 mm, erro da ordem de 0,2 %.

Para a resistência mecânica, o erro foi associado ao erro do equipamento utilizado, em torno de ± 1% do valor da tensão de ruptura do material.

Na análise granulométrica via difração a laser, a variação da repetibilidade do equipamento está na ordem de 0,5%.

A fim de controlar e minimizar acúmulos de erros, todos os corpos de provas foram caracterizados utilizando os mesmos equipamentos e com os mesmos parâmetros.

4.6 FASE 3: AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS *IN VITRO*

Os testes de liberação dos fármacos das matrizes dos dois conjuntos de cimentos foram realizados em solução tampão fosfato pH 7,0 (COLPO, 2007; FERNANDES et al., 2008; VALLET-REGI et al., 2008). A concentração dos fármacos, em função do tempo, foi determinada pela técnica de espectroscopia de absorção no Ultravioleta Visível (UV-vis) (ARCOS et al., 2009).

Para este estudo, foi necessário traçar os parâmetros para a curva de calibração em diferentes concentrações conhecidas dos fármacos testados, diluídos em solução tampão fosfato pH 7,0 (RANG et al., 2015; COLPO, 2007; FERNANDES et al. 2008; VALLET-REGI et al., 2008). A curva foi composta por amostras em triplicata dos eletrólitos contendo os corpos de prova isentos de fármacos (grupo controle), como forma de manter a linearidade e seletividade do método e controlar

alguma variável de interação que pudesse existir entre os fármacos incorporados na matriz dos conjuntos de cimentos estudados (BRASIL, 2003). Para tanto, foi elaborada a equação da reta e o coeficiente de determinação (R2) (MORAIS, 2011).

Com relação à avaliação da liberação dos fármacos, os corpos de prova (em triplicata) foram pesados e medidos, imersos em solução tampão (RANG et al., 2015) e submetidos ao ensaio, conforme os passos a seguir:

a) Para avaliar a liberação dos fármacos foi dispensado, em cada tubo de ensaio, 10 ml de solução tampão fosfato pH 7,0.
b) Cada tubo recebeu um corpo de prova que permaneceu submerso em solução tampão à temperatura de 37ºC e sob agitação constante (PAAVOLA et al., 1995). Os corpos de prova foram suspensos a fim de não tocarem no fundo do frasco, o que poderia dificultar a liberação do fármaco. Todos os tubos foram vedados para evitar evaporação (COLPO, 2007).
c) A solução-tampão, juntamente com o sistema de liberação, foi mantida sob agitação lenta a fim de simular o ambiente corpóreo humano (SILVA JÚNIOR; OREFICE, 2001; COLPO, 2007).
d) As liberações dos fármacos foram monitoradas por 90 dias, sendo: a cada 24 horas, durante os cinco primeiros dias; e, após, as amostras foram monitoradas nas horas quatro, oito, 24, 48, 72, 96, 144, 480, 720, 1.440 e 2.160 horas. As amostras foram constituídas pelos 10 ml de solução contidos nos tubos. A cada monitoramento, a solução foi totalmente substituída.
e) O processo de liberação foi analisado por UV-vis em um espectrofotômetro UV-visível Varian Cary 100, com cubeta de quartzo, caminho ótico de 1 cm. Os espectros para o UV-vis foram observados de acordo com o comprimento de onda correspondente à absorbância de cada fármaco, sendo considerando para o sulfato de gentamicina 249 nm (fabricante: Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda), cloridratos de: lidocaína 262 nm, bupivacaína 271 nm e levobupivacaína 260 nm (fabricante: Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda). Foram realizadas 32 varreduras com comprimento de onda na faixa de 190 nm e 600 nm.

4.6.1 Estudo da Cinética de Liberação dos Fármacos

A fim de descrever a cinética da liberação dos conjuntos incorporados pelos diferentes fármacos estudados, os dados obtidos a partir dos testes de liberação *in vitro* foram ajustados pelas equações a seguir relacionadas:

Equação 6. Higuchi (HIGUCHI, 1963)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^{1/2}$$

Equação 7. Korsmeyer-Peppas (KORSMEYER; PEPPAS, 1983)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

Equação 8. Lindner e Lippold (LINDNER; LIPPOLD, 1995).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^n + b$$

Equação 9. Peppas-Sahlin (PEPPAS; SAHLIN, 1989)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^n + K_2 t^{2n}$$

Para o cálculo da contribuição de cada mecanismo, utilizaram-se as equações 10 e 11 (PEPPAS; SAHLIN, 1989).

Equação 10. Difusão Fickiana

$$D = \frac{1}{1} + \left(\frac{K_2}{K_1}\right) t^n$$

Equação 11. Relaxamento das cadeias do polímero (Caso II)

$$\frac{R}{F} = \left(\frac{K_2}{K_1}\right) t^n$$

Onde M_t representa a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo *t*; e M_∞, a quantidade total de fármaco liberada num tempo infinito. *K* é a constante de velocidade de liberação para equação de Higuchi. Nas equações Korsmeyer e Peppas e Lindner e Lippold, *K* é uma constante cinética incorporando características estruturais e geométricas do sistema; o termo *b* descreve o mecanismo de liberação rápida a partir da superfície. Na equação Peppas e Sahlin, K_1 e K_2 são constantes e o primeiro termo ($K_1 t^n$) representa a contribuição difusional Fickiana (*D*), enquanto que o segundo termo ($K_2 t^{2n}$) representa a contribuição do relaxamento das cadeias poliméricas (*R*). Em todos os casos, *n* é o expoente de difusão Fickiana de um sistema, considerando sua forma geométrica.

4.6.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

Neste ensaio foram analisados apenas amostras de corpos de prova contendo o antibiótico sulfato de gentamicina (α-TCP Genta) e seu respectivo controle.

O ensaio in vitro foi realizado em duplicata, sob agitação lenta e temperatura constante a 37ºC. Os corpos de prova foram imersos, separadamente, em 10 ml de solução tampão fosfato (pH 7,0). A liberação do fármaco foi monitorada no período de 15 dias, sendo que foram coletadas alíquotas a cada 24 horas até os quatro primeiros dias. Após, as coletas foram realizadas nos dias oito e 15. As amostras foram constituídas pelos 10 ml de solução (eletrólito) contidos nos frascos.

O processo de liberação foi analisado por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), em um equipamento Autolab B.V.85802, modelo PG STAT 302 N (Metrohm Autolab, Holanda); e análise no módulo NOVA 1.10.4. Os parâmetros foram investigados na frequência de 10-100Hz e amplitude de 10-100mV. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, numa célula eletroquímica de vidro, com tampa hermeticamente fechada. Foi utilizado um sistema de três eletrodos, constituído por duas placas de platina (eletrodo de trabalho e contraeletrodo) e um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De acordo com Moore et al. (2016), a escolha dos métodos e modelos analíticos, para dados relacionados à área das ciências da saúde, é bastante criteriosa, e o modelo escolhido deve ser o mais robusto possível.

Assim, os testes paramétricos foram usados para as variáveis contínuas com distribuição normal e variâncias homogêneas; para as demais variáveis os testes aplicados foram não paramétricos. Para valores de populações amostrais iguais entre os grupos e variâncias similares aplicou-se ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey ou Bonferroni, de acordo com o número de grupos estudados. Para amostras únicas ou comparações entre dois grupos, utilizou-se o teste t de Student. Nos dados não paramétricos foram aplicados os testes Kruskal-Wallis para grupos maiores; para amostras únicas ou comparações entre dois grupos o teste de Wilcoxon (MOORE, *et al*. 2016). Para as diferenças analíticas entre os grupos estudados, considerou-se o intervalo de confiança (IC) de 95% com nível de significância menor que 5% ($p<0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 GRANULOMETRIA POR DIFRAÇÃO A *LASER*

A determinação da distribuição e do tamanho de partículas do pó de cimento α-TCP utilizado no estudo foi realizada pelo método de difração a *laser*. Os resultados da análise granulométrica do cimento de α-TCP, obtido após 8 horas de moagem, encontram-se descritos na tabela 3 e representados na figura 7.

Tabela 3. Distribuição e tamanho médio de partícula do pó de cimento α-TCP

Diâmetro (μm)	
Menor que	Após 8 horas de moagem
10%	1,17
50%	10,38
90%	29,24
Diâmetro médio	13,10

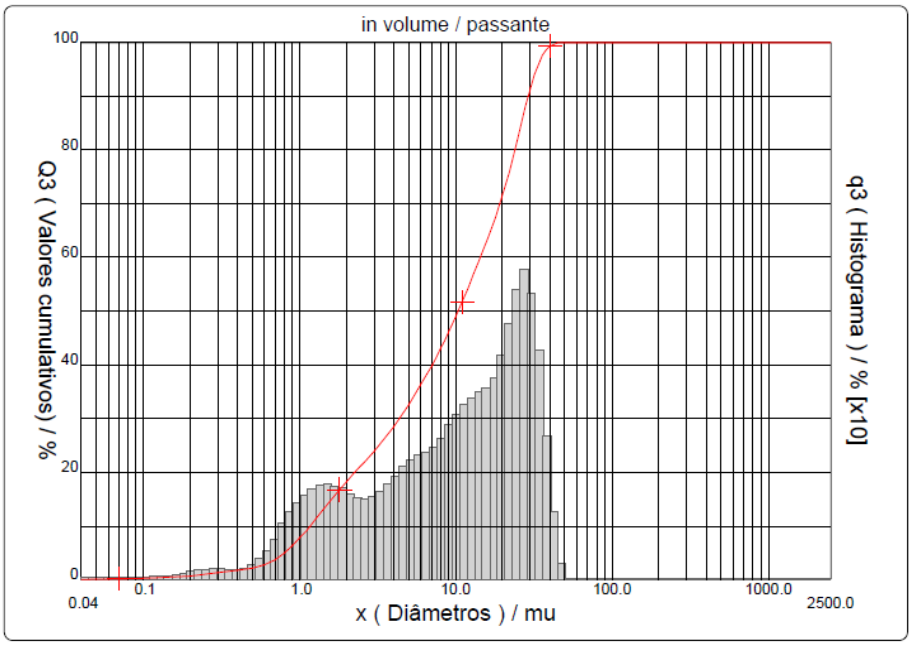


Figura 7. Análise Granulométrica do pó de cimento α-TCP

Neste estudo, os valores de tamanho de partículas, apresentados na tabela 3, encontram-se entre 29,24 e 1,17 μm, com tamanho médio de 13,1 μm, ou seja, elas são mais grossas do que a distribuição entre 20 e 2 μm, reportada por Chow et al. (1997).

O gráfico da figura 7 apresenta a distribuição do tamanho de partículas bimodal, que, segundo Machado (2007), pode estar relacionado à diferença na friabilidade das fases α-TCP e β-TCP.

O tamanho das partículas pode afetar as propriedades dos cimentos, a cinética de reação química, a plasticidade inicial, o tempo de pega, a resistência mecânica (GINEBRA et al., 1995), as propriedades de superfície, a área específica, a rugosidade e porosidade (GINEBRA et al., 2004) e, consequentemente, o perfil de liberação dos fármacos. Quanto menor o tamanho da partícula, maior é a área superficial e reação de presa (pega).

O tamanho dos grânulos influencia na porosidade do cimento. A proporção de poros está associada à menor ou maior fragilidade, portanto, reduzindo-se o tamanho desses grânulos, reduz-se a porosidade (SHIMA et al.,1979).

O tamanho das partículas exerce influência na quantidade de líquido usada para a formação da pasta e o tempo de pega do cimento. A diminuição desse tamanho, diminui a quantidade de líquido necessária a formação da pasta cimenticia, aumenta a área superficial específica e a reação de presa (DRIESSENS et al., 1994; CHOW et al., 1997; SANTOS, 2002). Essas alterações são de ordem micro e nanoestrutural, influenciando a absorção de proteínas e a adesão dos osteoblastos, ou seja, constituem-se fator fundamental que deve ser utilizado como parâmetro de ajuste comportamental do cimento de acordo com a aplicação clínica desejada (BOYAN et al., 1999).

Para manter quantidade de líquido com 2,5% de Na_2HPO_4 utilizado (0,3 ml/g), em conformidade ao reportado por Driessens (1994), Fernández (1995a) e Santos (2002), o tamanho de partículas obtido, neste estudo, foi adequado à relação líquido/pó para a obtenção da pasta com a consistência desejada.

5.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os ensaios de difração de raios X (DRX) permitem detectar reações que possam interferir nas precipitações das fases desejadas à manutenção das propriedades do biomaterial.

Os difratogramas ilustrados pelas figuras 8 e 9 representam as diferentes fases obtidas dos dois conjuntos de cimentos utilizados neste estudo. Os picos assinalados nos difratogramas correspondem às fichas de padrão de difração de número 00-009-0348 e 00-029-0359 (α-TCP); 00-009-0169 (β-TCP) e 00-009-0432 (hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA): $Ca_9(HPO_4(PO_4)_5OH)$ do *International Centre for Diffraction Data* (ICDD).

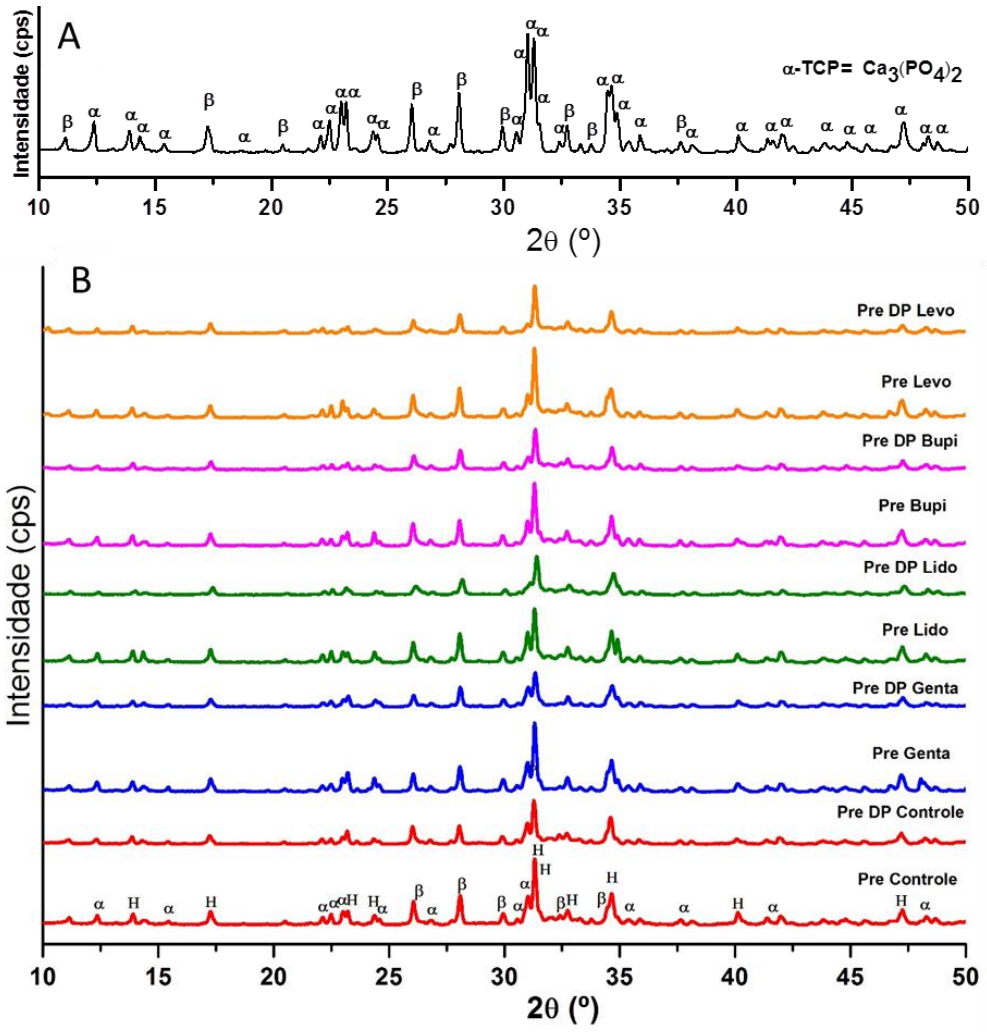


Figura 8. Difratogramas de raios X: (A) pó do cimento α-TCP anterior a reação de pega; (B) grupos que compõem os subconjuntos Pré-testes dos cimentos α-TCP e α-TCP DP. Sendo α= fase α-TCP, H= hidroxiapatita e β= fase β-TCP

De acordo a análise do pó do cimento, o difratograma ilustrado na figura 8A, denota que este pó de cimento obtido foi composto de α-TCP como fase majoritária, acrescida de uma pequena proporção da fase β-TCP como fase indesejada. A figura 8B, traz os resultados da análise dos corpos de prova após submissão a 100% de umidade relativa, onde já é possível identificar a formação inicial de hidroxiapatita (BERMUDEZ et al., 1994; GINEBRA et al., 1997; SANTOS, 2002; ALVES, 2005; MACHADO, 2007; ESCOBAR, 2010; VASCONCELLOS, 2012; VOLKMER, 2013).

Ao comparar os resultados dos difratogramas entre o grupo controle e os grupos compostos por fármacos, percebeu-se que, em ambos os subconjuntos, os diferentes fármacos não interferiram na reação de cura dos cimentos. Da mesma forma, para os cimentos aditivados com o hidrogel, que constituem os cimentos dupla pega, não ocorreu inibição do avanço dessa reação, conforme já observado por Santos (2002).

A figura 9 apresenta os difratogramas dos grupos que formam os subconjuntos de cimentos Pós-testes (α-TCP e α-TCP DP), onde se observa a formação da CDHA (VAN KEMENADE, 1987). Ressalta-se que, para estes subconjuntos, as análises foram realizadas ao final do estudo de liberação, ou seja, após 90 dias em que os corpos de prova ficaram imersos em solução tampão fosfato pH 7, sob temperatura de 37ºC (± 1 ºC).

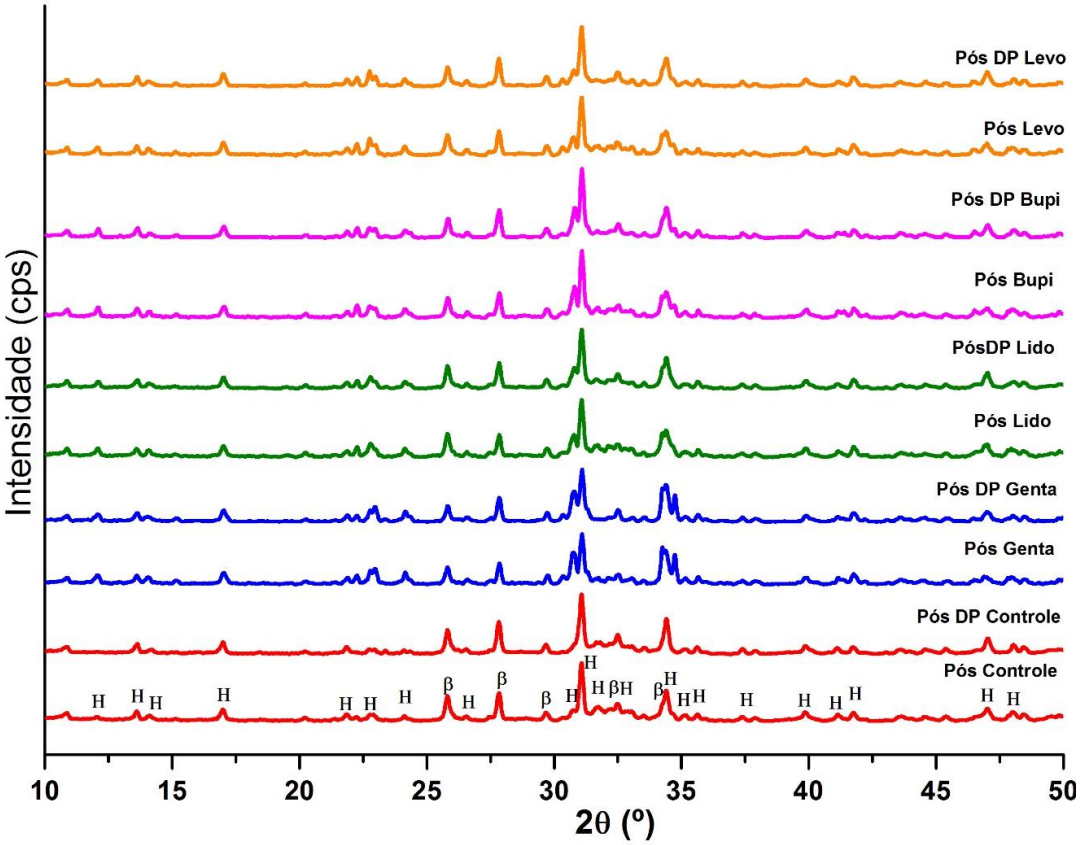


Figura 9. Difratogramas de raios X para os grupos que compõem os subconjuntos Pós-testes dos cimentos α-TCP e α-TCP DP, sendo H= hidroxiapatita e β= fase β-TCP

Ao final do estudo de liberação *in vitro*, notou-se que ocorreu a precipitação da fase de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), decorrente da dissolução da fase α-TCP, e com permanência da fase β-TCP devido à sua maior estabilidade química (SANTOS, 2002; ALVES, 2005). Os picos de CDHA apresentaram maior largura, provavelmente, influenciados pelo tamanho dos cristais de hidroxiapatita HA, e menor cristalinidade (SANTOS, 2002). Ainda, de acordo com os difratogramas, identifica-se similaridade entre os grupos constituídos tanto por acrilamida quanto por fármacos e seus respectivos contoles, os quais compõem os conjuntos estudados. Ou seja, a quantidade de acrilamida e fármacos presente nos corpos de prova não interferiu na formação das fases dos cimentos e na reação de precipitação da CDHA.

Todas as composições, comparadas aos seus respectivos controles, foram, praticamente, as mesmas, indicando que as quantidades adicionadas, tanto do aditivo acrilamida quanto dos diferentes fármacos, não interferiram nos produtos advindos da reação após os ensaios de liberação dos fármacos.

5.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Os compósitos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, conforme as figuras 10 e 11, que apresentam os resultados dos espectros de infravermelho das composições dos diferentes conjuntos e grupos estudados.

Após 72 horas da reação de pega, os conjuntos de cimentos α-TCP apresentaram as seguintes bandas de absorção: 471, 565, 601, 1038 e 1090 cm^{-1} referentes à ligação P-O ou grupos PO_4; 961, 1210, 2940 e 2970 cm^{-1}, referentes à ligação P-OH modo de estiramento de grupos HPO_4; 873, 1414, 1454, 2337 e 2368 cm^{-1}, referentes à ligação C-O de grupos CO_3 em hidroxiapatita carbonatada; 1615 e 3000 a 3700 cm^{-1}, referente à H_2O adsorvida; deformação axial de C-H alifático entre 2940 e 2970 cm^{-1} (MOLINS, 1996; SANTOS, 2002; ALVES, 2005; MACHADO, 2007; ESCOBAR, 2010; VASCONCELLOS, 2012; FERNANDES, 2013; THÜRMER, 2014). Para o conjunto dupla pega, igualmente a Santos (2002), observou-se a banda 1640 cm^{-1} referente à amida I e deformação axial de C=O (superposição).

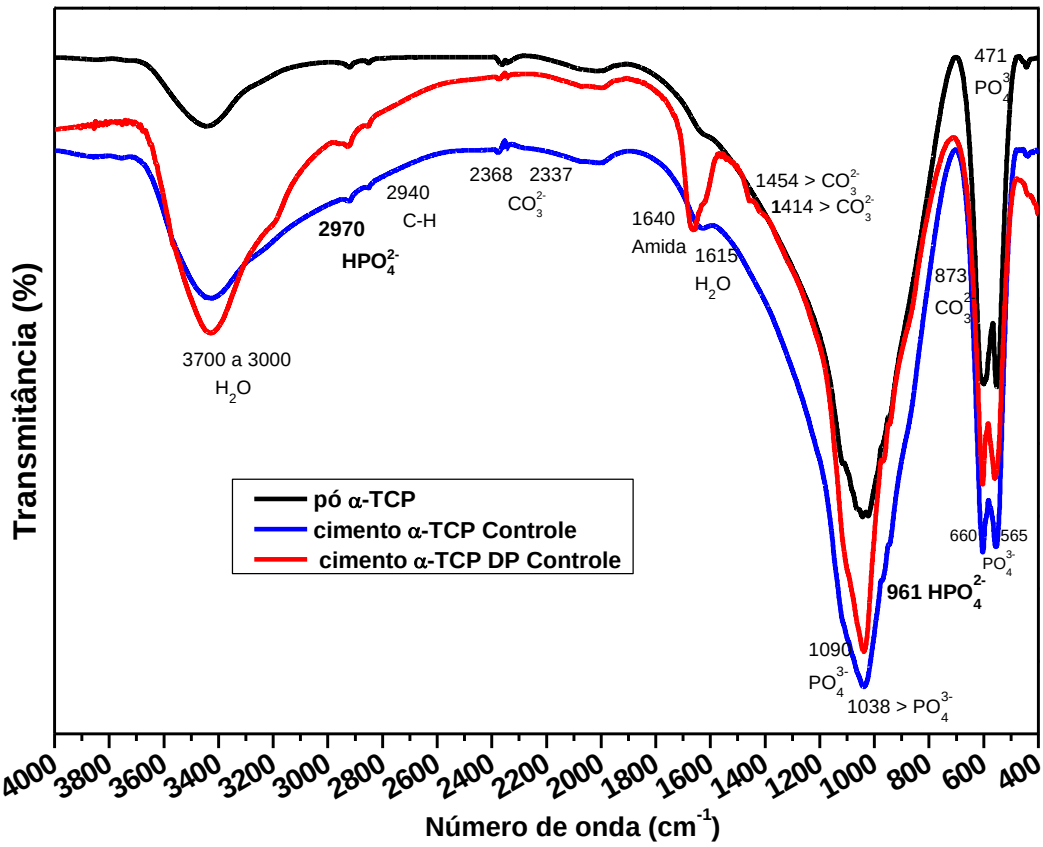


Figura 10. FT-IR do pó de α-TCP (sem hidratação), e dos cimentos α-TCP e α-TCP DP Controle após hidratação, com identificação do grupamento químico característico da CDHA (negrito)

As bandas largas observadas no espectro do pó de α-TCP obtido anterior à reação de cura (Figura 10) representam sua baixa cristalinidade (LEGEROS, 1991), atribuída ao choque térmico durante sua produção (SANTOS, 2002).

A figura 11 representa os espectros das amostras adicionadas de fármacos e o grupo controle dos dois conjuntos estudados.

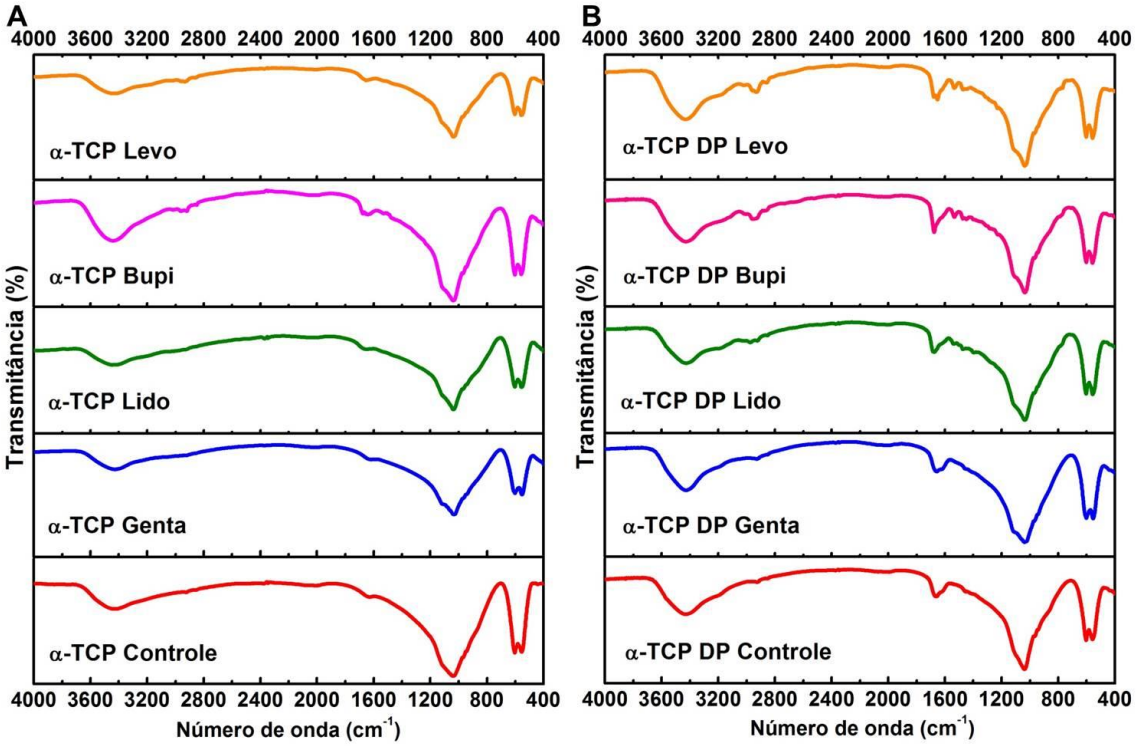


Figura 11. FT-IR das amostras de cada grupo que constituiu o subconjunto Pré-teste: (A) subconjunto cimento α-TCP; (B) subconjunto cimento α-TCP DP

Para ambos os conjuntos estudados, a adição dos fármacos não interferiu no produto final da reação de precipitação da hidroxiapatita. A hidroxiapatita produzida pela reação de hidratação dos cimentos α-TCP era deficiente em cálcio em virtude da detecção da banda referente ao grupamento HPO_4^{2-} (940 e 2970 cm^{-1}), característico desse tipo de hidroxiapatita (LE GEROS, 1991; SANTOS, 2002). Não foi possível identificar os grupos funcionais dos fármacos envolvidos, isso pode estar relacionado à baixa quantidade desses fármacos nos corpos de provas.

Neste estudo, assim como no estudo de Santos (2002), não foi possível atribuir algum tipo de ligação às bandas de absorção 1997 e 2076 cm^{-1}. Segundo esse autor, essas bandas, também, foram relatadas por Rigo (1995) e Le Geros (1991) sem as respectivas identificações.

As principais diferenças nos espectros dos conjuntos, relacionaram-se à presença das bandas de absorção de CO_3^{2-} (1414 e 1454 cm^{-1}), da amida I (1640 cm^{-1}) e da H_2O absorvida (3000 e 3700 cm^{-1}) no Conjunto α-TCP DP. De acordo com a Figura 11B, a proeminência da banda em torno de 2960 cm^{-1} é atribuída à poliacrilamida presente na composição (SANTOS, 2002).

As bandas CO_3^{2-} são características da hidroxiapatita carbonatada (SANTOS, 2002). O espectro indica que as quantidades de íons CO_3^{2-} variaram, tanto entre os conjuntos de cimentos (sendo mais proeminente no conjunto dupla pega), quanto nos diferentes grupos constituídos pelos fármacos. Santos (2002) comparou, por diferentes períodos de tempo, durante seis semanas, os conjuntos com e sem o aditivo acrilamida, que foram imersos em fluido corpóreo simulado (SBF). Ao final de três semanas, encontrou a presença dessas bandas menos acentuadas nas composições aditivadas. Supôs, então, que a redução da quantidade de CO_3^{2-} ocorreu devido à menor porosidade daquela composição e que, também, não seria possível estabelecer qualquer relação com a variação entre as quantidades de íons CO_3^{2-}, porque a absorção de CO_2 pode ter sofrido influência da melhor ou pior conformação dos corpos de prova. Para o corrente estudo, a mesma suposição de Santos (2002) pode ser atribuída aos grupos constituídos pelos diferentes fármacos.

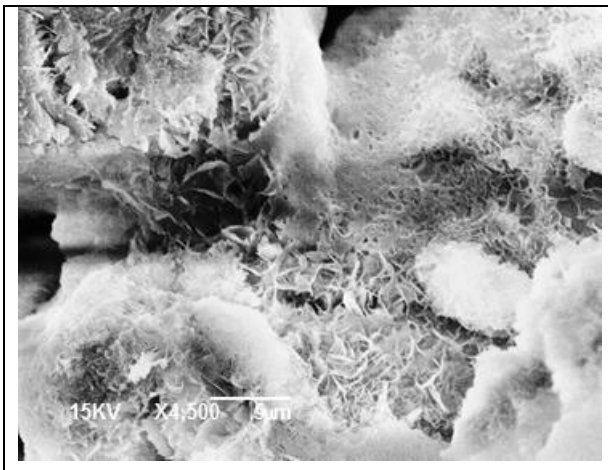
Ao comparar os dois conjuntos de cimentos, com e sem o hidrogel, evidenciaram-se bandas proeminentes, referentes ao grupamento CO_3^{2-} no conjunto aditivado (dupla pega), com destaque as amostras constituídas com os fármacos anestésicos locais. Tal resultado permite confirmar a hipótese de Santos (2002) de que a acrilamida influencia a absorção de CO_2 e que, neste estudo, evidencia-se a intensificação dessa influência pela presença dos fármacos, especialmente, os anestésicos locais, visto que tais bandas são menos proeminentes no conjunto composto por cimentos isentos de acrilamida.

Por meio dos espectros é possível identificar que as amostras constituídas pelos fármacos anestésicos locais promovem maior absorção de água, sendo que, no conjunto de cimento dupla pega, a absorção de água foi mais intensa do que no conjunto isento do aditivo acrilamida, segundo Santos (2002), tal observação é atribuída à higroscopicidade da poliacrilamida contida na composição.

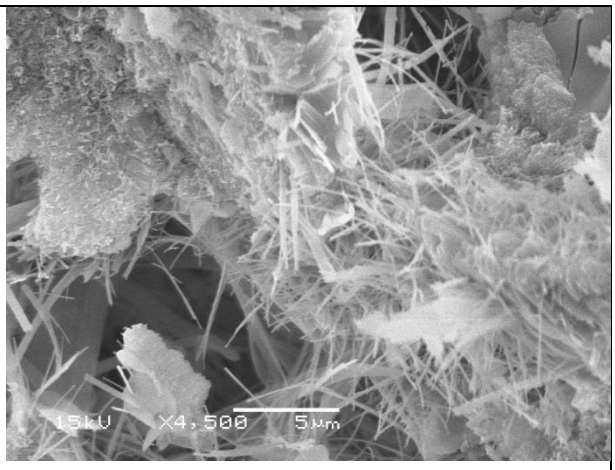
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foram realizadas avaliações microestruturais a fim de comparar as diferentes formulações agregadas aos cimentos α-TCP e α-TCP de dupla pega, e, também, entre ambos, anterior e posteriormente ao início do estudo de liberação dos fármacos *in vitro*.

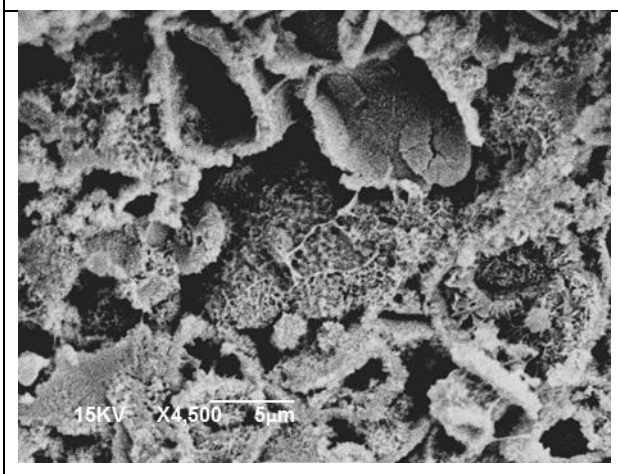
A figura 12 mostra as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura dos corpos de prova estudados.



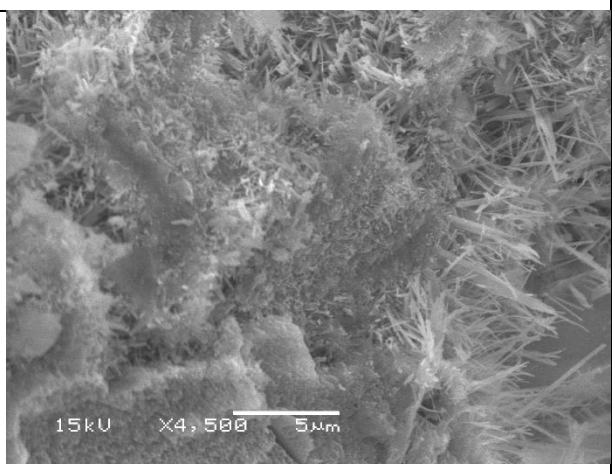
Pré α-TCP Controle



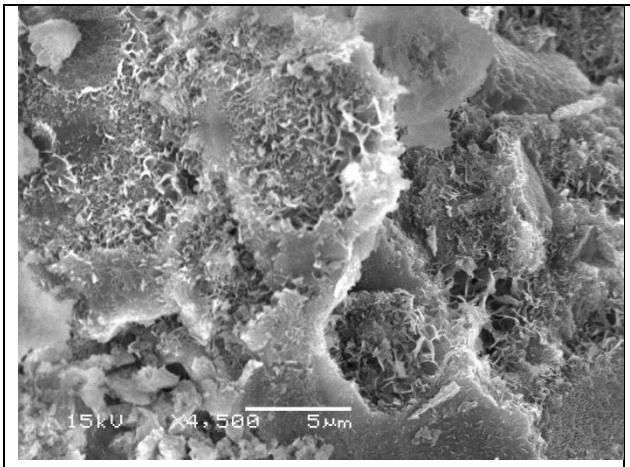
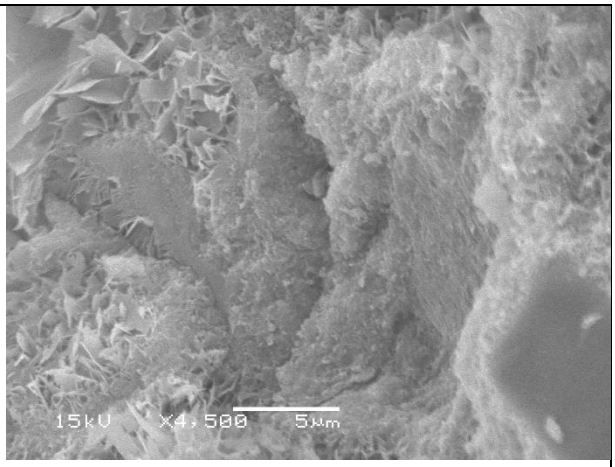
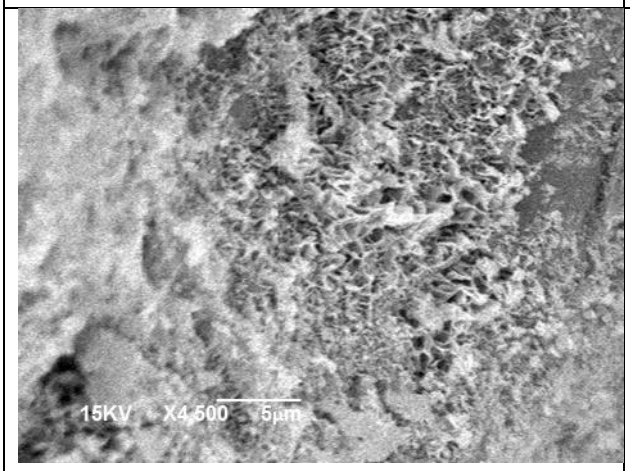
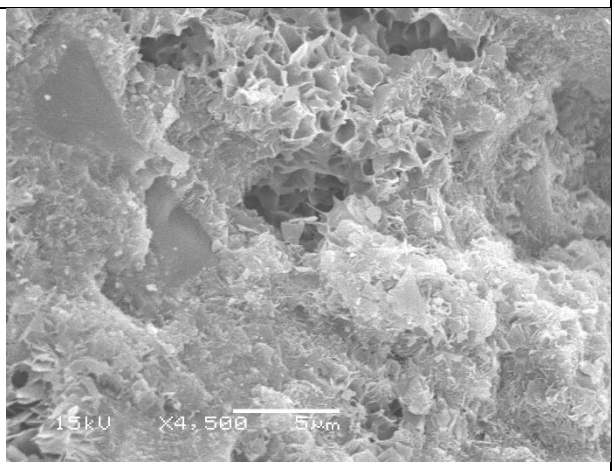
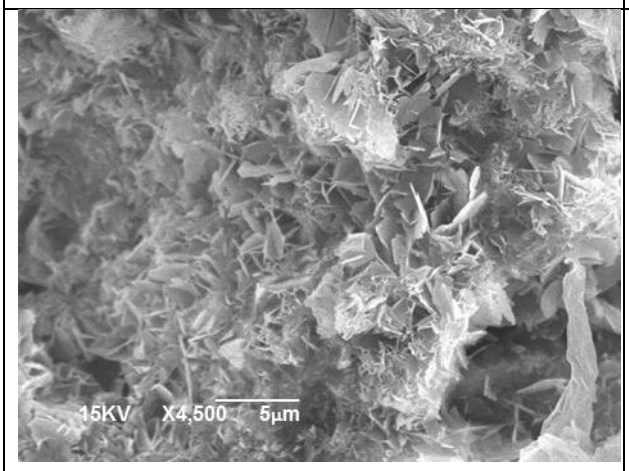
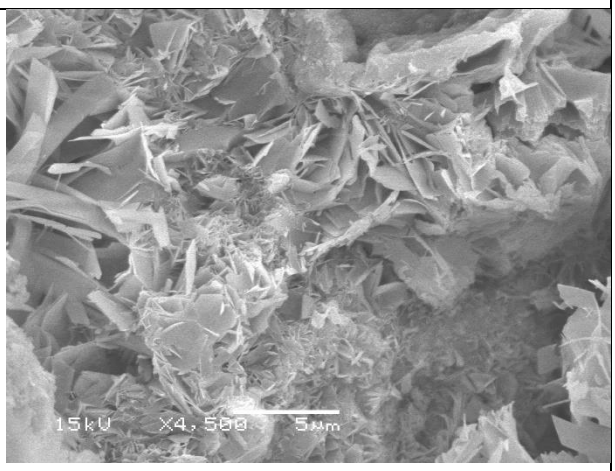
Pós α-TCP Controle

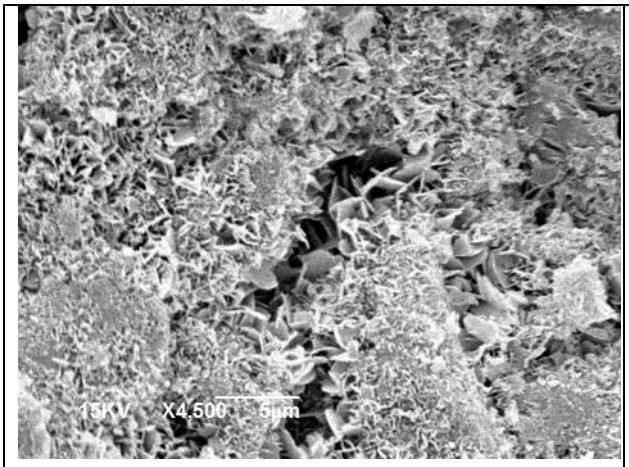
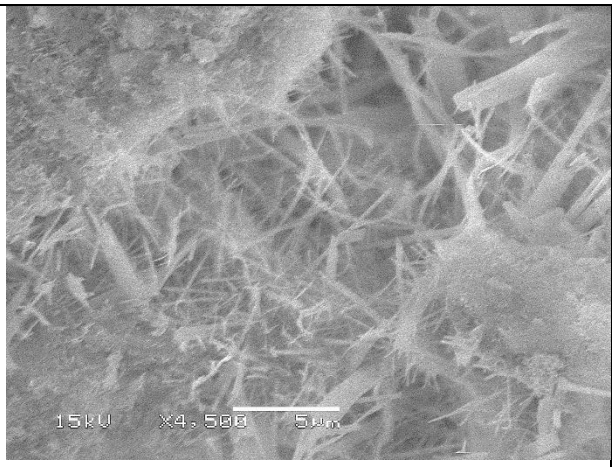
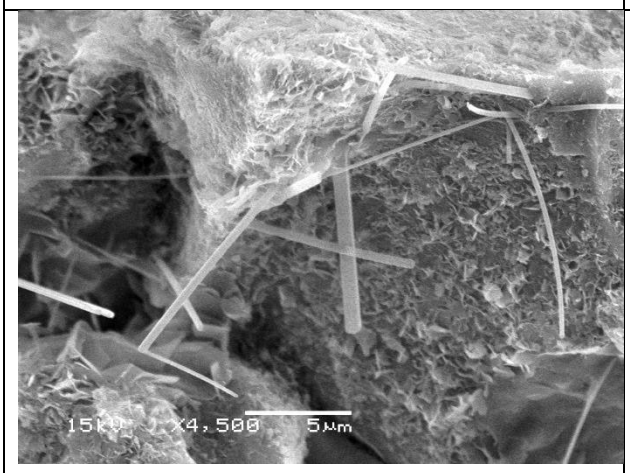
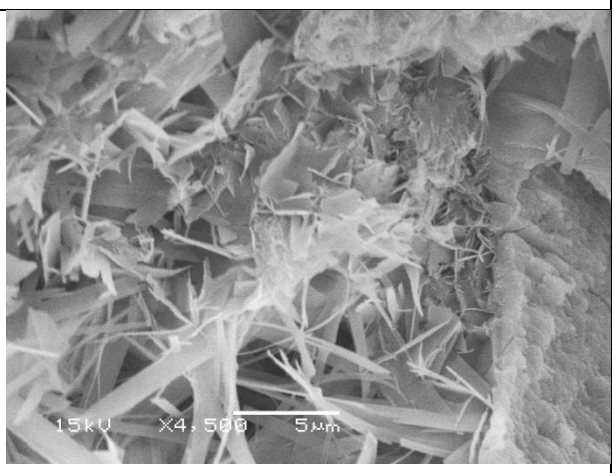
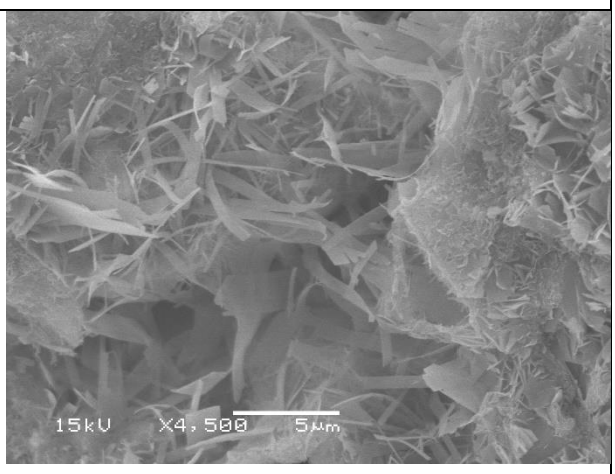


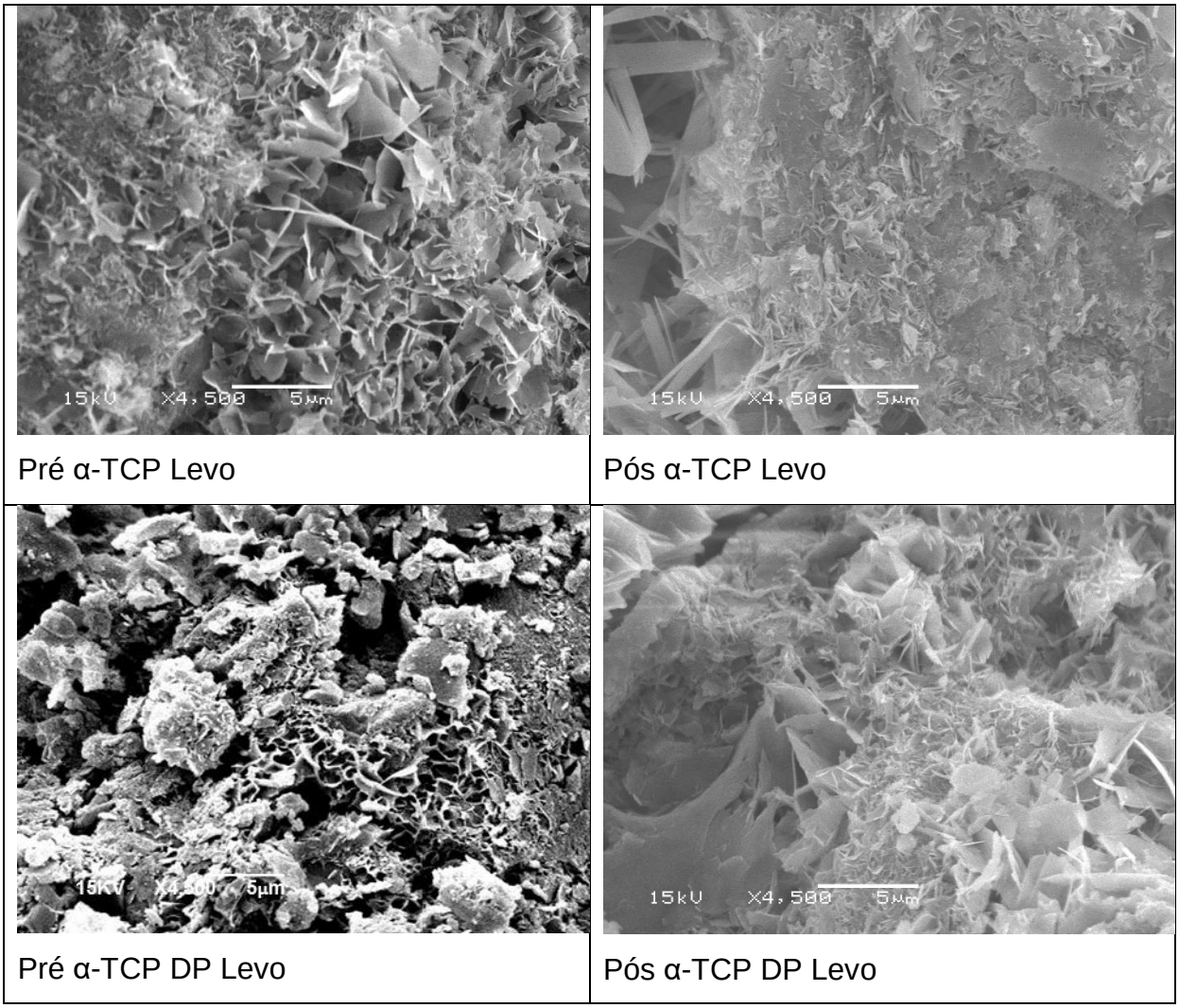
Pré α-TCP DP Controle



Pós α-TCP DP Controle

	
Pré α-TCP Genta	Pós α-TCP Genta
	
Pré α-TCP DP Genta	Pós α-TCP DP Genta
	
Pré α-TCP Lido	Pós α-TCP Lido

	
Pré α-TCP DP Lido	Pós α-TCP DP Lido
	
Pré α-TCP Bupi	Pós α-TCP Bupi
	
Pré α-TCP DP Bupi	Pós α-TCP DP Bupi



Pré α-TCP Levo	Pós α-TCP Levo
Pré α-TCP DP Levo	Pós α-TCP DP Levo

Figura 12.Fotomicrografias eletrônicas de varredura com imagens dos diferentes grupos que integram os subconjuntos Pré e Pós-testes (X4,500). Coluna da esquerda os grupos que compõem o subconjunto pré-teste e à direita os grupos que compõem o subconjunto pós-teste

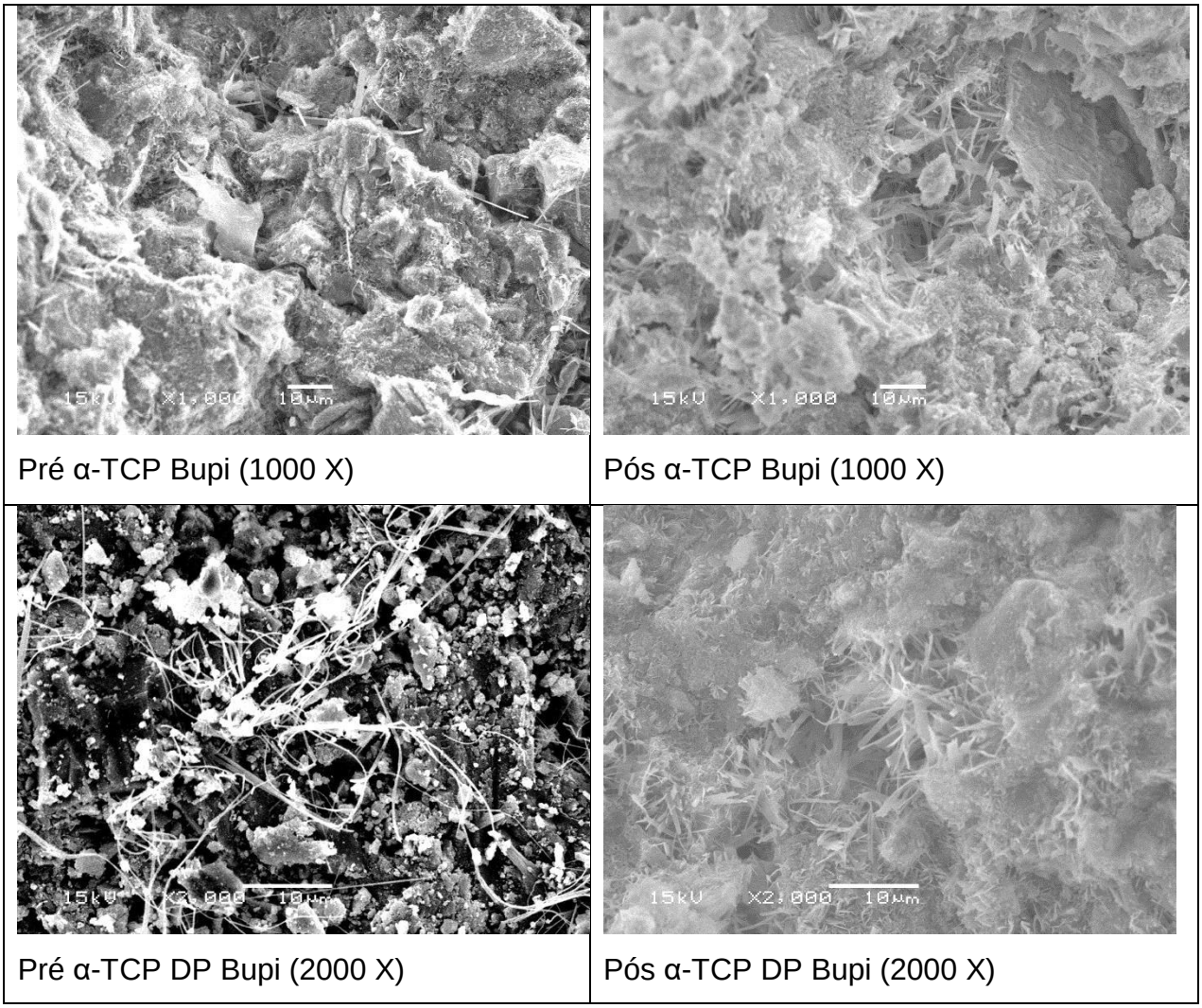
Como resultado da reação líquido-pó do cimento, foi possível observar, além da concentração de poros, a presença de agulhas ou placas petaloides que formam um entrelaçado cristalino (característico dos cimentos α-TCP), que é responsável pela resistência mecânica do cimento (GRUNINGER et al., 1984; YU et al., 1992; GINEBRA et al., 1995; DRIESSENS et al., 1997; SANTOS, 2002; GINEBRA et al., 2006).

As morfologias visíveis nas imagens da figura precedente são muito similares às descritas por Driessens (1997), que argumentou, em seu estudo, que são típicas dos cimentos de fosfato tricálcicos e originadas do processo de hidratação, cujas menores partículas são dissolvidas; e as maiores diminuem de proporção.

Em conformidade aos resultados obtidos por Alves (2005), os produtos dessa hidratação apresentam a tendência a cristalizarem-se próximos às partículas maiores de TCP em hidratação, visto que o espaço entre essas partículas é limitado, o que explica o aparente revestimento que se forma ao redor delas, conferindo ao material relativa resistência, especialmente, para o subconjunto Pós-teste, já que este esteve por maior tempo imerso em solução tampão.

Ao comparar as microestruturas representadas pela figura 12, todas as amostras apresentaram a microestrutura típica promovida pela formação da hidroxiapatita, ou seja, não foram percebidas diferenças morfológicas marcantes com relação à incorporação, tanto do hidrogel quanto dos diferentes fármacos, com exceção aos grupos constituídos pelo fármaco cloridrato de bupivacaína, que será discutido posteriormente. Portanto, após a supersaturação promovida pela dissolução das formas metaestáveis, as formas estáveis, em todas as amostras, sem exceção, cresceram na forma de cristais, em conformidade ao estudo de Santos (2002).

As imagens das amostras carregadas com o fármaco bupivacaína, tanto para o grupo de cimento α-TCP Bupi, quanto para o grupo α-TCP DP Bupi, antes do início do estudo de liberação *in vitro*, apresentam estruturas filamentosas que lembram “bigodes de gatos” (nome adotado a partir deste momento), as quais não são encontradas nas amostras Pós-testes, ou seja, após o estudo de dissolução *in vitro* (Figura 13).



Pré α-TCP Bupi (1000 X)	Pós α-TCP Bupi (1000 X)
Pré α-TCP DP Bupi (2000 X)	Pós α-TCP DP Bupi (2000 X)

Figura 13. Fotomicrografias eletrônicas de varredura em diferentes aumentos comparando as imagens pré-testes dos grupos α-TCP Bupi (coluna da esquerda) e α-TCP DP Bupi (coluna da direita), com a presença dos "bigodes de gatos", e as imagens pós-testes dos grupos α-TCP Bupi (coluna da esquerda) e α-TCP DP Bupi (coluna da direita), sem os "bigodes de gatos"

De acordo com os estudos de Siegel (2012), grande parte das moléculas dos fármacos, à temperatura ambiente, forma cristais, podendo assumir inúmeras formas cristalinas polimórficas ou hidratos cristalinos de acordo com as condições de processamento. Essas moléculas podem assumir uma forma vítrea e amorfa com diferentes estabilidades termodinâmicas, tanto durante o armazenamento quanto após a administração do fármaco.

Este autor coloca em seus achados o exemplo do fármaco cloridrato de bupivacaína, que pode assumir sua fase sólida, inclusive, em tecido, pois essa cristalização está associada, também, às diferenças de concentrações do meio, conforme evidenciado pelas imagens dos corpos de prova constituídos pelo fármaco

em questão, conforme figura 14, a qual representa recorte ampliado da fotomicrografia do grupo Pré α-TCP DP Bupi apresentada na figura 13.

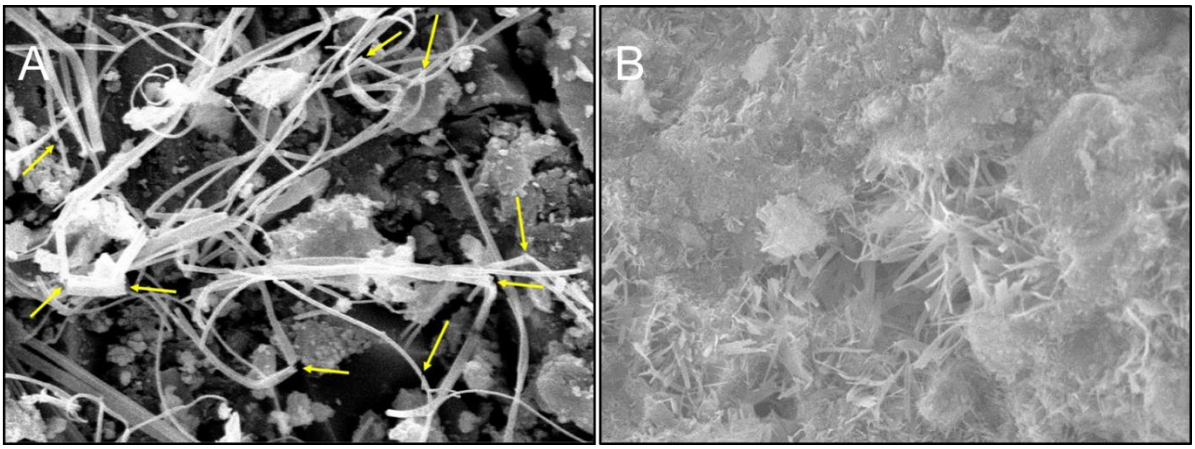


Figura 14. Fotomicrografia eletrônica de varredura com aumento de 2.000 X (10 µm): A- grupo Pré α-TCP DP Bupi com destaque (setas amarelas) de fraturas dos "bigodes de gatos"; B- grupo Pós α-TCP DP Bupi sem os "bigodes de gatos"

A existência de fraturas, destacadas pelas setas amarelas, na figura 14A, pode constituir indícios de que se trata de estruturas rígidas, provavelmente, formadas pela precipitação ou cristalização relacionada ao fármaco, já que não são observadas nas análises após o ensaio de liberação *in vitro* (pós-teste). A orientação, dos "bigodes de gatos", pode estar relacionada com a dispersão e concentração do fármaco no cimento.

Segundo Siegel (2012), a solubilidade de um fármaco é uma propriedade termodinâmica, porém a taxa de dissolução é uma propriedade cinética, pois aumenta e diminui de acordo com a solubilidade. Tal afirmação pode ser comprovada neste estudo, pois nos grupos após o estudo de liberação *in vitro*, quando os corpos de prova ficaram imersos em solução tampão fosfato por 90 dias, os cristais micrografados na figura 14A desapareceram por solubilização, conforme figura 14B.

5.5 MÉTODO DE ARQUIMEDES E ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO E TAMANHO DE POROS POR IMAGENS

5.5.1 Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente e Absorção de líquido

Neste estudo, para a caracterização das amostras quanto à Porosidade total, Porosidade aparente, Absorção de líquido e Densidade aparente, foram utilizados 50 corpos de prova (N= 50), sendo metade dos corpos de prova para cada subconjunto, cimentos Pré-teste α-TCP (n= 25) e Pré-teste α-TCP DP (n= 25), em que cada grupo, que constituiu os subconjuntos, foi representado por cinco corpos de prova (n= 5). Para todas as amostras, foram calculadas as medidas de tendência central a fim de descrever os subconjuntos e grupos envolvidos no estudo in vitro, conforme a tabela disponível no Anexo I.

Com base na análise das medidas de tendência central, percebeu-se que a variância apresentou homogeneidade, visto que o baixo coeficiente de variação não possui valores superiores a 40%, podendo considerar que a distribuição foi simétrica para todos os dados. Dessa forma, a fim de aceitar ou refutar a hipótese verdadeira, de que exista diferença entre os subconjuntos e entre os grupos estudados, aplicou-se ANOVA para a análise da variância e para as comparações múltiplas entre as médias, o teste t de Student para os dois conjuntos e para os grupos o teste de Tukey, com nível de significância de 95%, cujos resultados estão representados na figura 15 e na tabela no Anexo II.

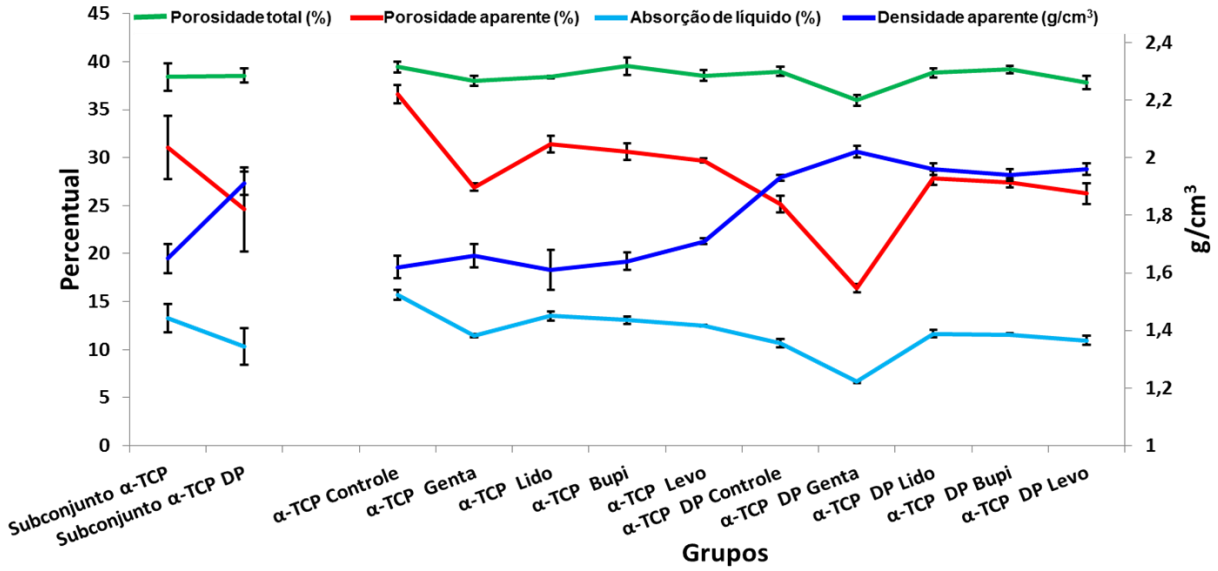


Figura 15. Diferenças entre as médias de acordo com as variáveis analisadas para a Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente e Absorção de líquido (N= 50)

De acordo com os resultados das comparações, fornecidas por meio da aplicação dos testes paramétricos, entre o subconjunto dos cimentos α-TCP e α-TCP DP (Anexo II), para todas as técnicas apresentadas, foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$), ao nível de significância de 5%, com exceção das médias da Porosidade total (95% IC= 0,01 - 1,23; p= 0,05). Contudo vale destacar o curto valor do intervalo de confiança, ou seja, resultando em um valor de comparação não muito robusto. Esses resultados corroboram Santos (2002), assim, reafirmando a forte influência do hidrogel no cimento α-TCP, o qual diminuiu o percentual de porosidade.

Para a Densidade aparente, conforme os valores das medidas de tendência central (Anexo I), os fármacos presentes no subconjunto α-TCP contribuíram para o seu aumento, com exceção ao grupo α-TCP Lido, no qual o anestésico cloridrato de lidocaína diminuiu a densidade, porém, conforme estudo analítico (Anexo II), essa diminuição não foi significativa em relação ao respectivo grupo Controle (95% IC= -0,084 - 0,07; p> 0,05). Já para o subconjunto α-TCP DP (dupla pega), todos os fármacos contribuíram ou mantiveram o aumento da densidade.

Os valores médios da densidade aparente encontrados neste estudo estão de acordo com os valores médios de densidade de vértebras humanas de 0,17 g/cm3 (variando de 0,09 a 0,34 g/cm^3) relatados por Banse, Sims e Bailey (2002).

Para a Porosidade total, os valores das medidas de tendência central (Anexo I) informam que os fármacos contribuíram para a diminuição da porosidade, tanto para o subconjunto α-TCP quanto ao subconjunto α-TCP DP, à exceção dos grupos constituídos pelo fármaco cloridrato de bupivacaína (Bupi). Entretanto, de acordo com os dados analíticos (Anexo II), estes aumentos não foram significativos em comparação aos seus respectivos controles (α-TCP Bupi: 95% IC= -1,26 – 1,09; p> 0,05 e α-TCP DP Bupi: 95% IC= -1,71 – 0,64; p> 0,05).

No tocante à Porosidade aparente, no subconjunto α-TCP, os valores das medidas de tendência central (Anexo I) demonstram que a presença dos fármacos contribuiu para sua diminuição. Ao contrário, para o subconjunto α-TCP DP, os fármacos aumentaram essa porosidade aparente. Esse aumento não interferiu nos resultados, conforme os estudos analíticos (Anexo II), de forma que o subconjunto de cimentos α-TCP apresentou o percentual de porosidade aparente significativamente maior que o subconjunto de cimentos α-TCP DP (95% IC= 4,26 - 8,65; p< 0,01). O grupo constituído pelo antibiótico sulfato de gentamicina (α-TCP DP Genta) diminuiu significativamente a porosidade aparente em relação ao controle do mesmo conjunto (95% IC= 7,17 - 10,31; p< 0,01) e ao seu análogo do subconjunto isento do hidrogel (95% IC= 8,97 – 12,11; p< 0,01). A presença do antibiótico no subconjunto de cimentos α-TCP DP não interferiu no resultado observado na comparação entre os subconjuntos, pois esse resultado manteve-se o mesmo na análise comparativa sem o grupo α-TCP DP Genta (95% IC= 4,013 – 6,856; p< 0,01).

Na Absorção de líquidos, as análises apontam que o subconjunto de cimentos α-TCP absorveu significativamente maior quantidade de líquido que o subconjunto α-TCP DP (95% IC= 1,47 – 1,93; p< 0,01). Os fármacos, também, contribuíram, significativamente, para o decremento da absorção de querosene para o subconjunto de cimentos α-TCP, conforme tabela analítica no Anexo II. O contrário foi observado para o subconjunto de cimentos α-TCP DP, com exceção aos grupos constituídos pelo antibiótico, que diminuíram significativamente a absorção em relação ao seu controle (α-TCP DP Controle) (95% IC= 3,27 – 4,78; p<0,01), e ao grupo integrado pelo anestésico local cloridrato de levobupivacaína (α-TCP DP Levo), que, apesar de aumentar a absorção, o aumento não foi significativo quando comparado ao seu respectivo controle (95% IC= -0,47 – 1,05; p> 0,05).

Tais resultados corroboram os achados de Santos (2002), que, em seu estudo, coloca que o hidrogel presente no cimento dupla pega influenciou o aumento da densidade aparente e a diminuição da porosidade aparente. Portanto, neste estudo, os dados encontrados na porosidade total e absorção de líquido confirmam os resultados de Santos (2002).

Conforme Driessens (1997), o valor da porosidade aparente varia de acordo com o maior ou menor empacotamento das partículas de cimento. Dessa forma, a análise dos dados permitiu considerar que a presença da acrilamida contribuiu para maior empacotamento das partículas de cimento, pois, para os grupos isentos dessa substância, há menor empacotamento dessas partículas.

Nos grupos compostos pelo antibiótico sulfato de gentamicina (α-TCP Genta e α-TCP DP Genta), a densidade aparente ficou acima do reportado em literatura, e tanto a Porosidade total e aparente quanto a Absorção de líquido, abaixo do reportado em literatura. Segundo Bohner et al. (1997), a presença dos íons sulfato do antibiótico proporcionariam maior resistência mecânica aos cimentos. De acordo com Hench (1998a), a diminuição da porosidade aumenta a resistência mecânica dos cimentos. Assim, os resultados sugerem que o fármaco potencializou os efeitos do sistema hidrogel, promovendo, ainda, maior empacotamento das partículas de cimento.

Ainda de acordo com Hench (1998a), apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento tecidual, o que, in vivo, aumenta essa resistência.

German (1999) coloca que o poro, além da quantificação, também, pode ser caracterizado de acordo com sua forma, seu tamanho, sua distribuição e conectividade. Por ser tridimensional, as técnicas utilizadas para a sua medição são imprecisas, sendo que a microscopia eletrônica é uma das principais técnicas utilizadas para a medição do poro, além da porosimetria de mercúrio, picnometria e metalografia quantitativa. Neste estudo, utilizaram-se a microscopia eletrônica de varredura e o software livre ImageJ, conforme exposto a seguir.

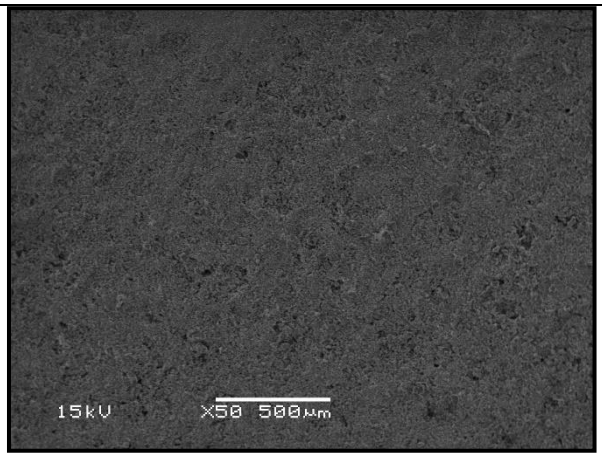
5.5.2 Análise de quantificação e tamanho de poros por imagens

Conforme Karageorgiou, Kaplan (2005) e Whang et al. (1999), para as células ósseas, o crescimento tecidual se dá de acordo com o tamanho dos poros, assim,

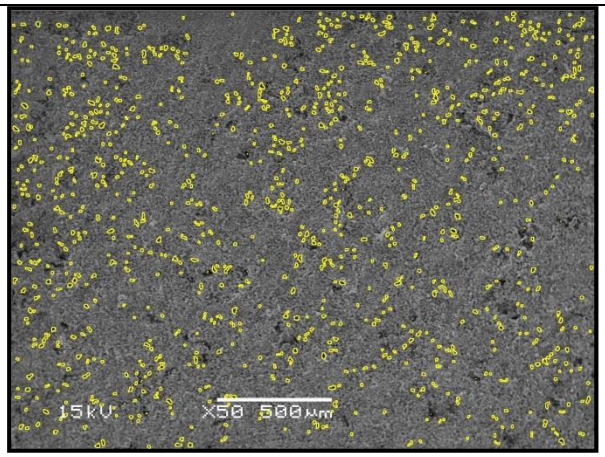
poros menores que 5 µm permitem a neovascularização; entre 10 e 75 µm, há penetração apenas de tecido fibroso, o que colabora para a fixação mecânica; entre 75 e 100 µm, ocorre a formação de tecido osteoide, e, poros acima de 100 µm permitem o crescimento e a regeneração do tecido ósseo, ou seja, o tamanho dos poros influenciam a osteointegração (FERNÁNDEZ et al., 2005b). Clemow et al. (1981) observou que poros com tamanho médio entre 400 e 800 µm ocorre crescimento de tecido fibroso.

Assim, para este estudo, optou-se por caracterizar a porosidade compreendida entre 70 e 400 µm. O estudo buscou comparar as micrografias dos corpos de prova antes e após o estudo de liberação dos fármacos *in vitro*, que perdurou por 90 dias. Para isso, as amostras que antecederam ao estudo de liberação foram nominadas “Pré”, já as que sucederam o referido estudo, “Pós”.

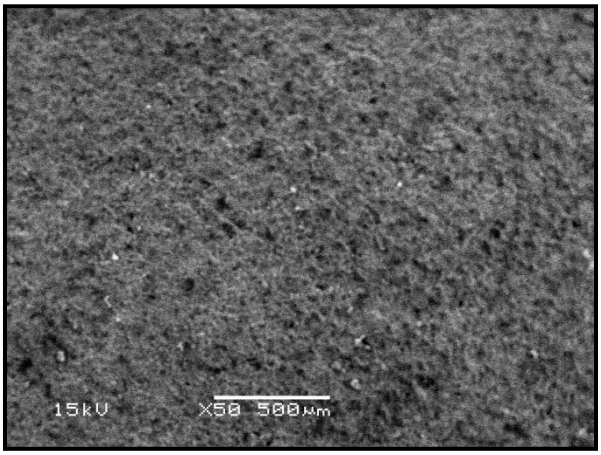
As micrografias apresentadas na figura 16 provém dos corpos de prova submetidos ao ensaio de compressão diametral, que foram lixados a fim de uniformizar a superfície a ser visualizada. Corresponde às imagens de cada formulação estudada, representadas pela letra (a) e, à direita, letra (b), a mesma imagem (a) com destaque aos poros entre 70 e 400 µm.



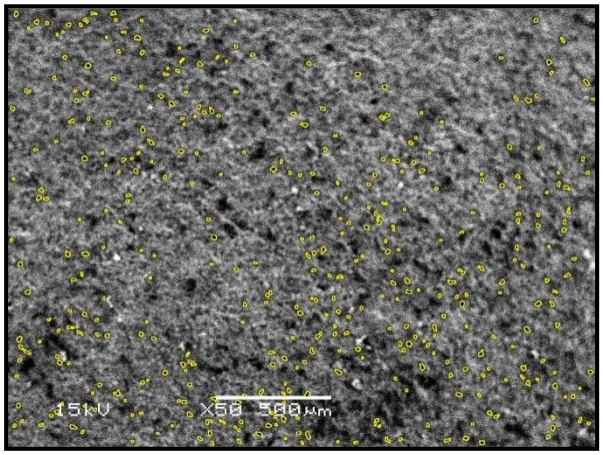
Pré α-TCP Controle (a)



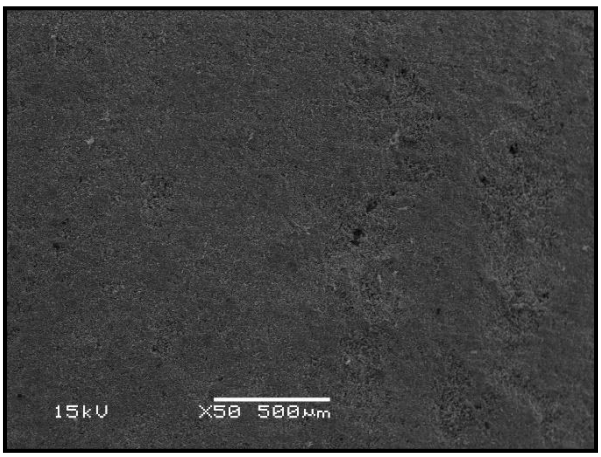
Pré α-TCP Controle (b)



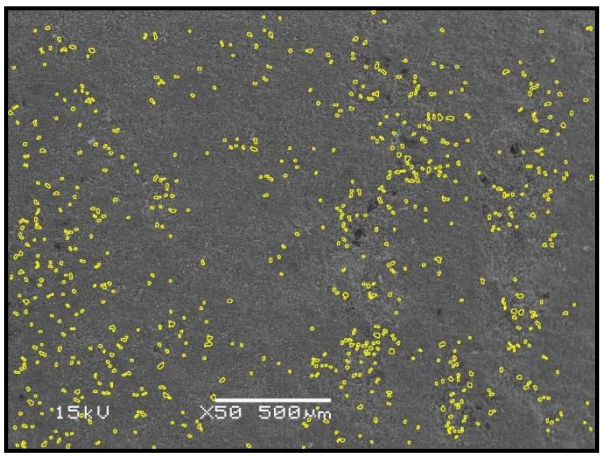
Pós α-TCP Controle (a)



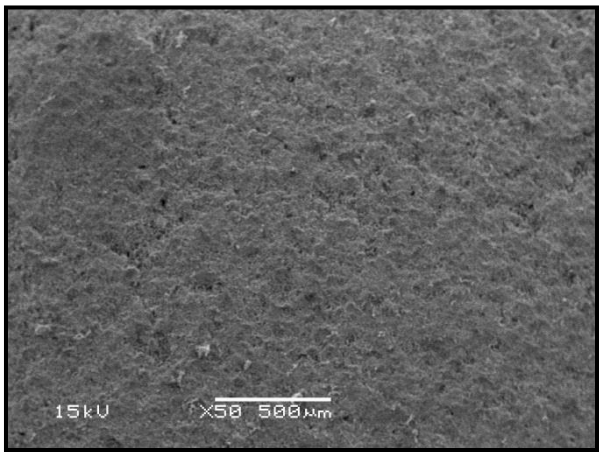
Pós α-TCP Controle (b)



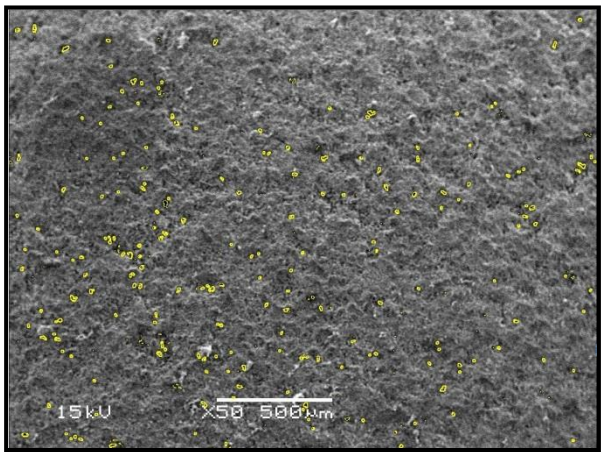
Pré α-TCP DP Controle (a)



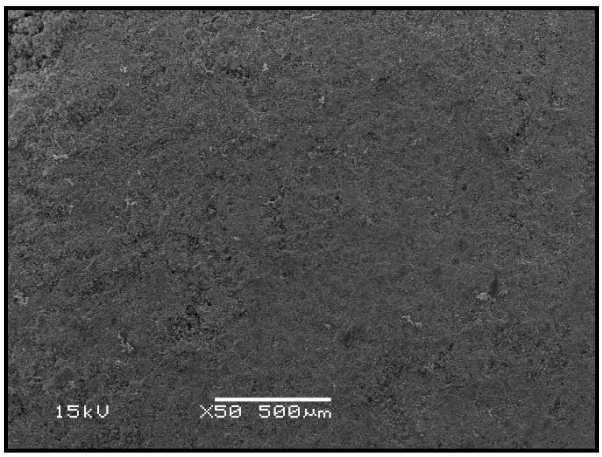
Pré α-TCP DP Controle (b)



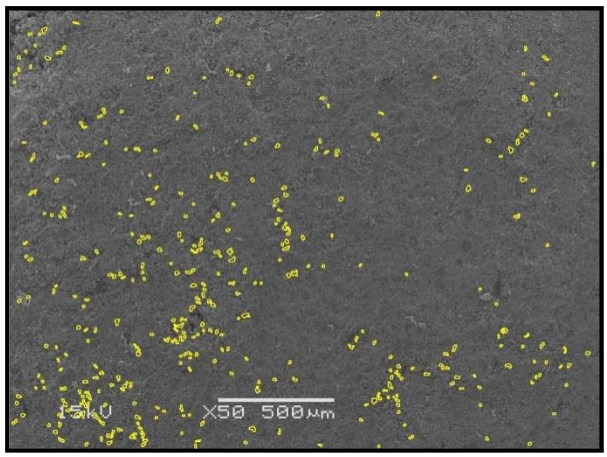
Pós α-TCP DP Controle (a)



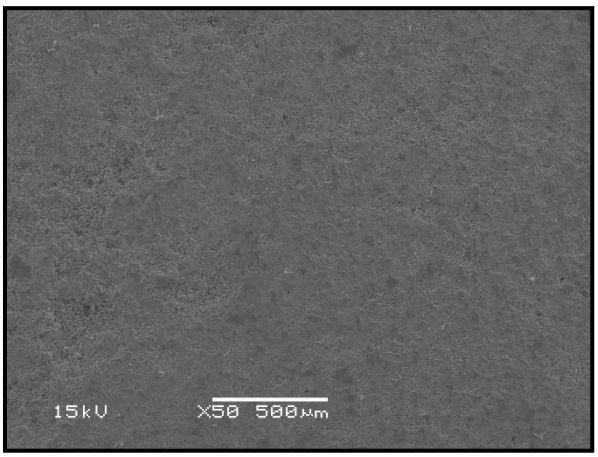
Pós α-TCP DP Controle (b)



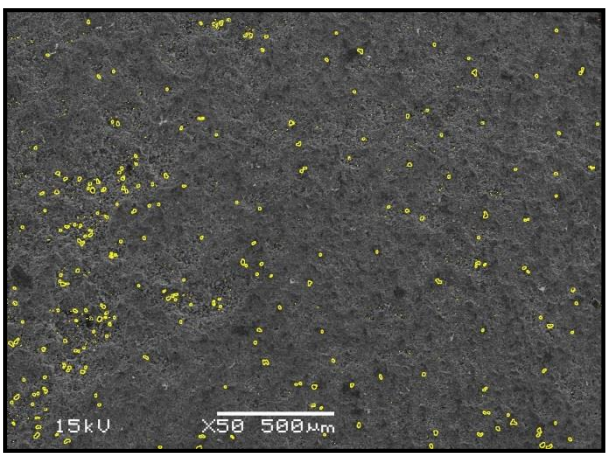
Pré α-TCP Genta (a)



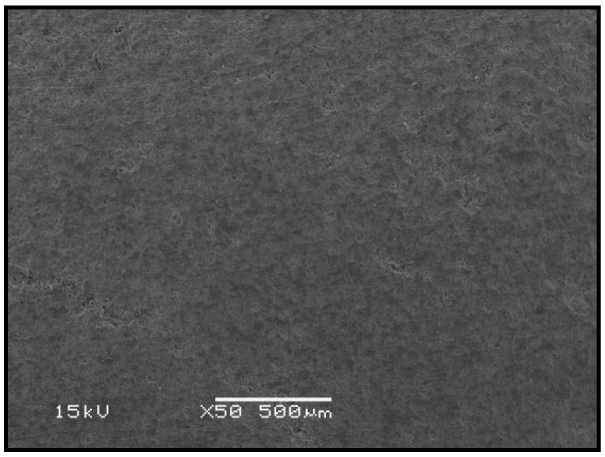
Pré α-TCP Genta (b)



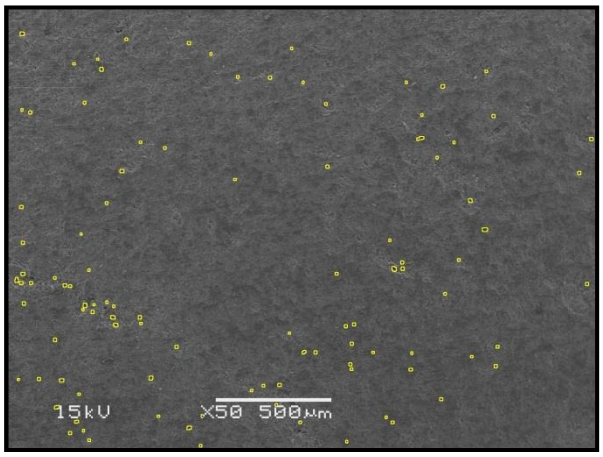
Pós α-TCP Genta (a)



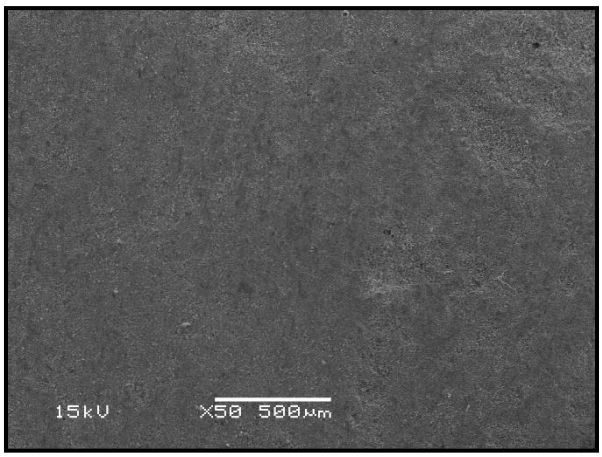
Pós α-TCP Genta (b)



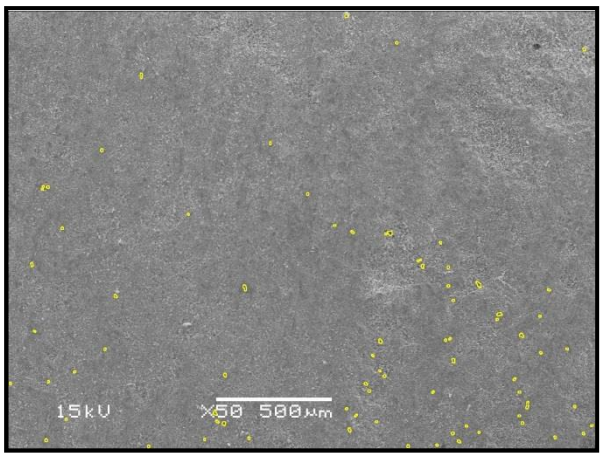
Pré α-TCP DP Genta (a)



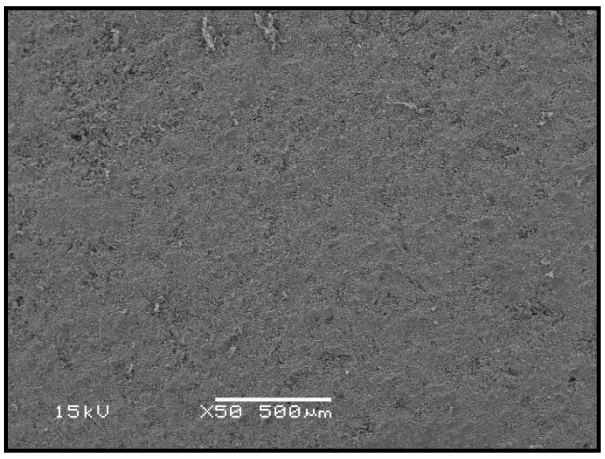
Pré α-TCP DP Genta (b)



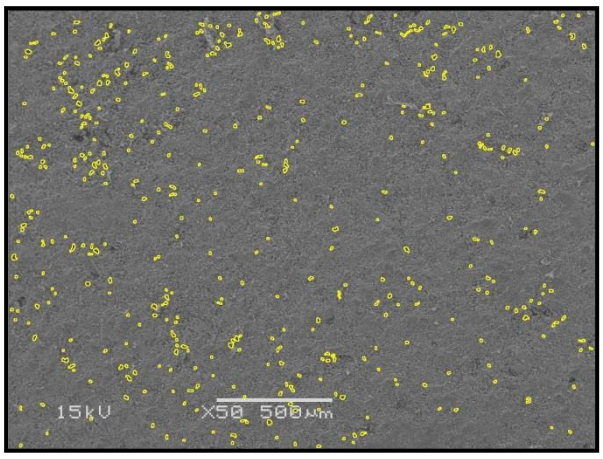
Pós α-TCP DP Genta (a)



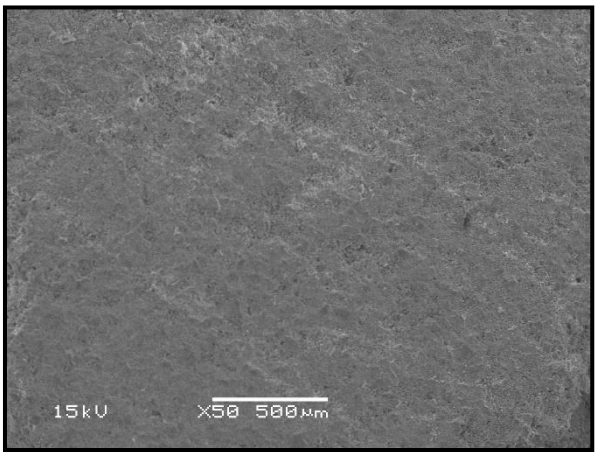
Pós α-TCP DP Genta (b)



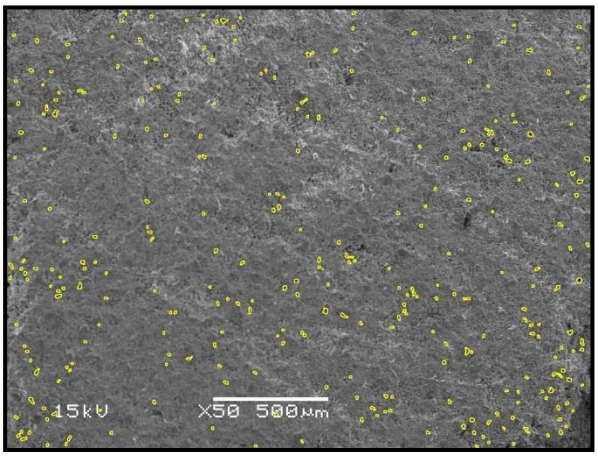
Pré α-TCP Lido (a)



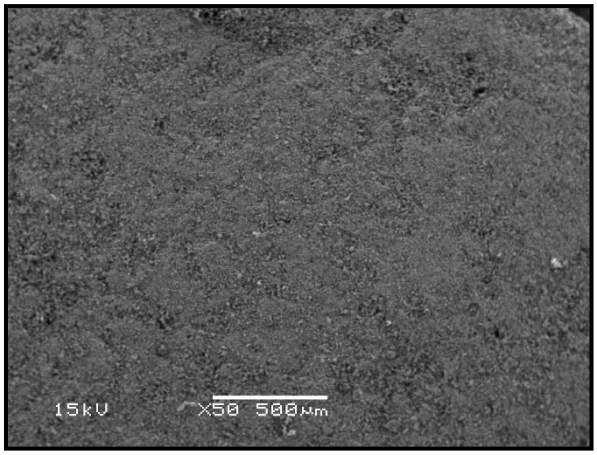
Pré α-TCP Lido (b)



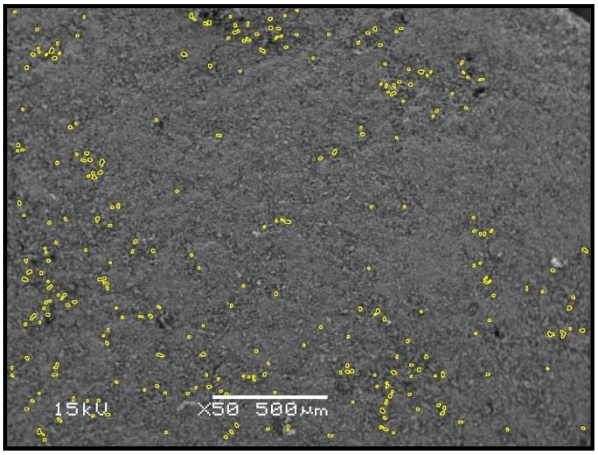
Pós α-TCP Lido (a)



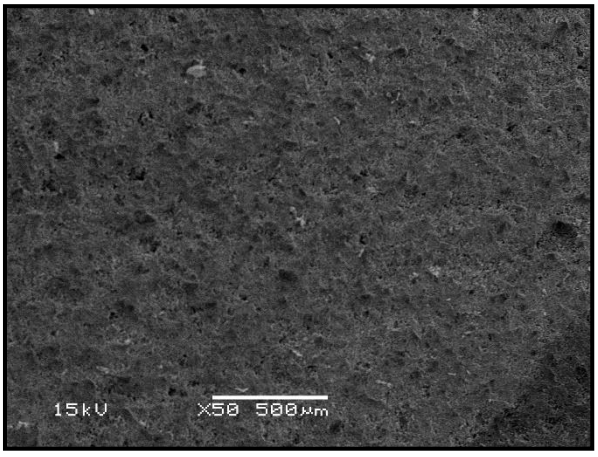
Pós α-TCP Lido (b)



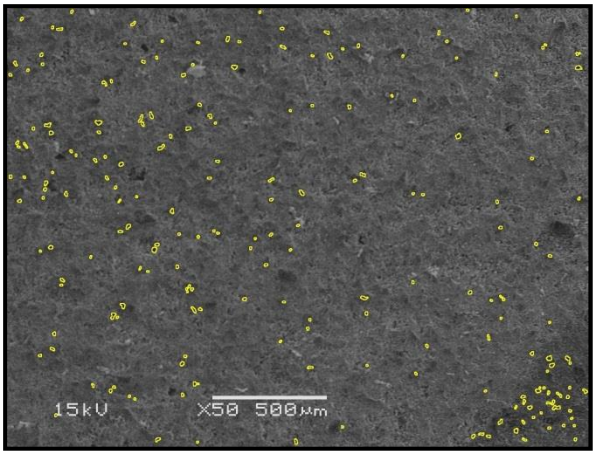
Pré α-TCP DP Lido (a)



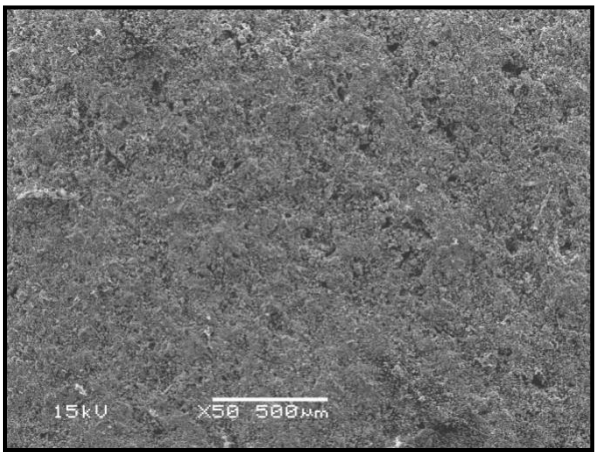
Pré α-TCP DP Lido (b)



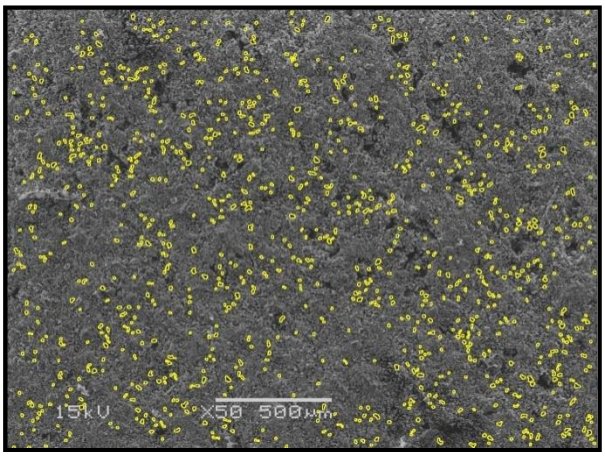
Pós α-TCP DP Lido (a)



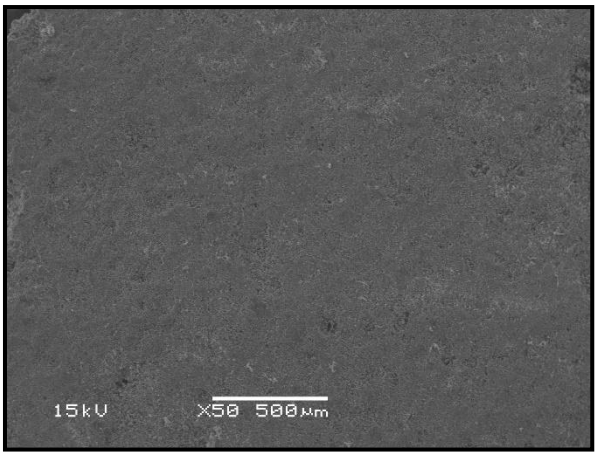
Pós α-TCP DP Lido (b)



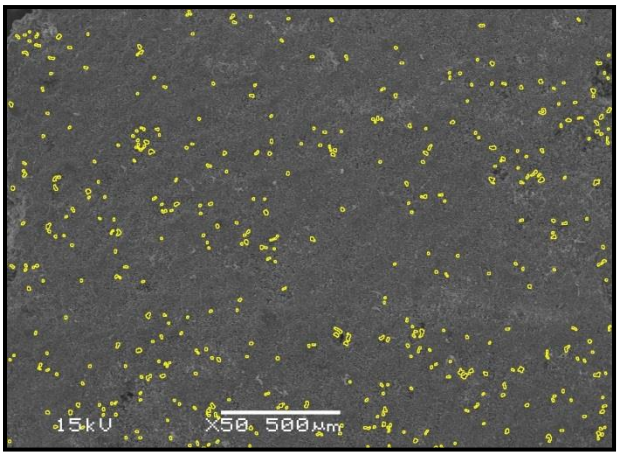
Pré α-TCP Bupi (a)



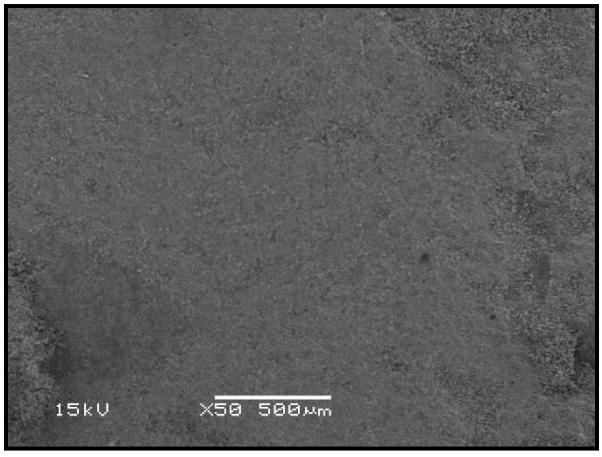
Pré α-TCP Bupi (b)



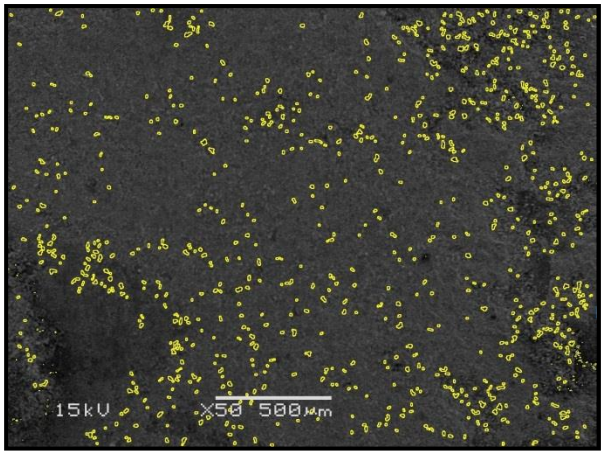
Pós α-TCP Bupi (a)



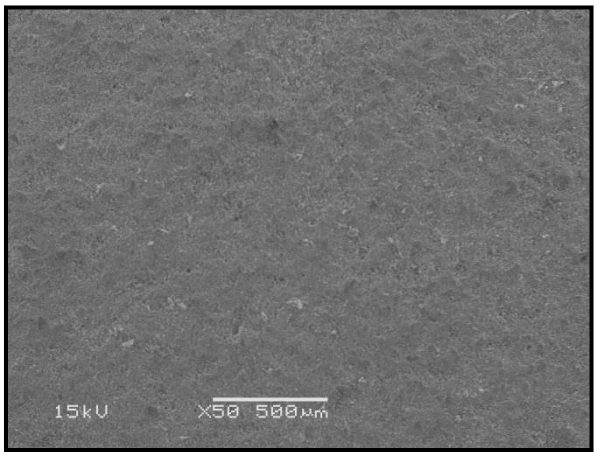
Pós α-TCP Bupi (b)



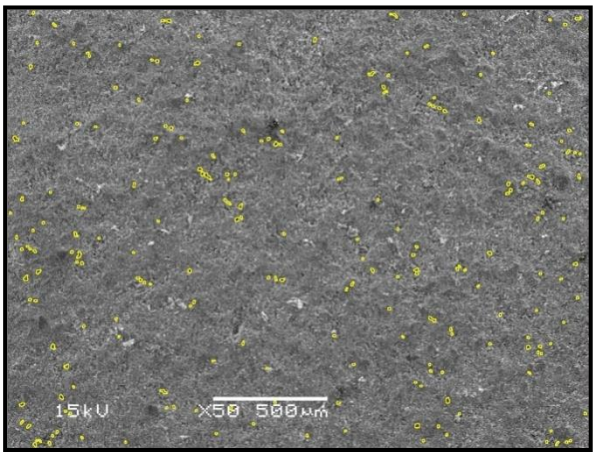
Pré α-TCP DP Bupi (a)



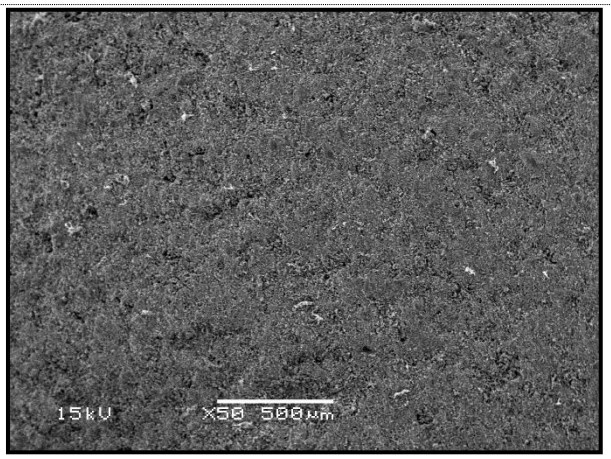
Pré α-TCP DP Bupi (b)



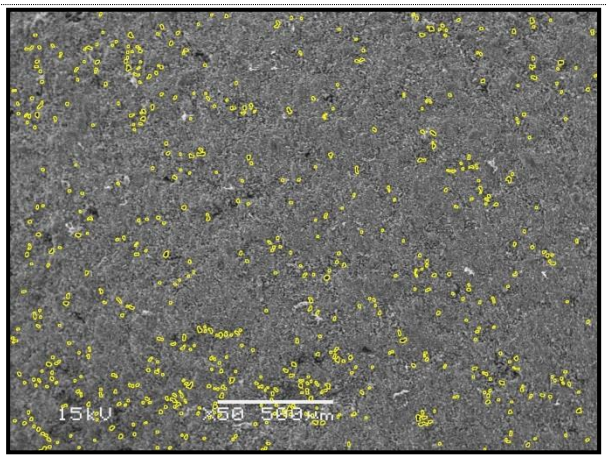
Pós α-TCP DP Bupi (a)



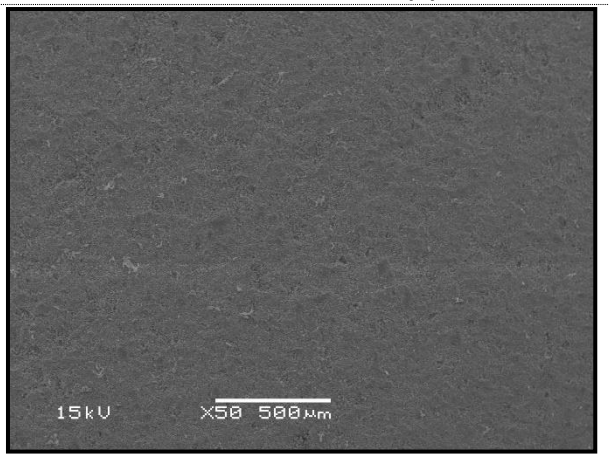
Pós α-TCP DP Bupi (b)



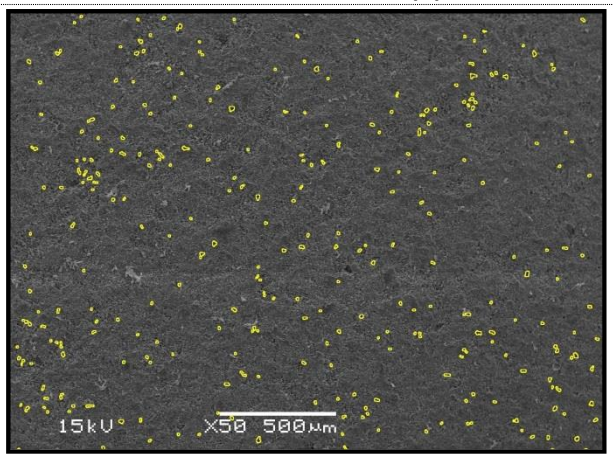
Pré α-TCP Levo (a)



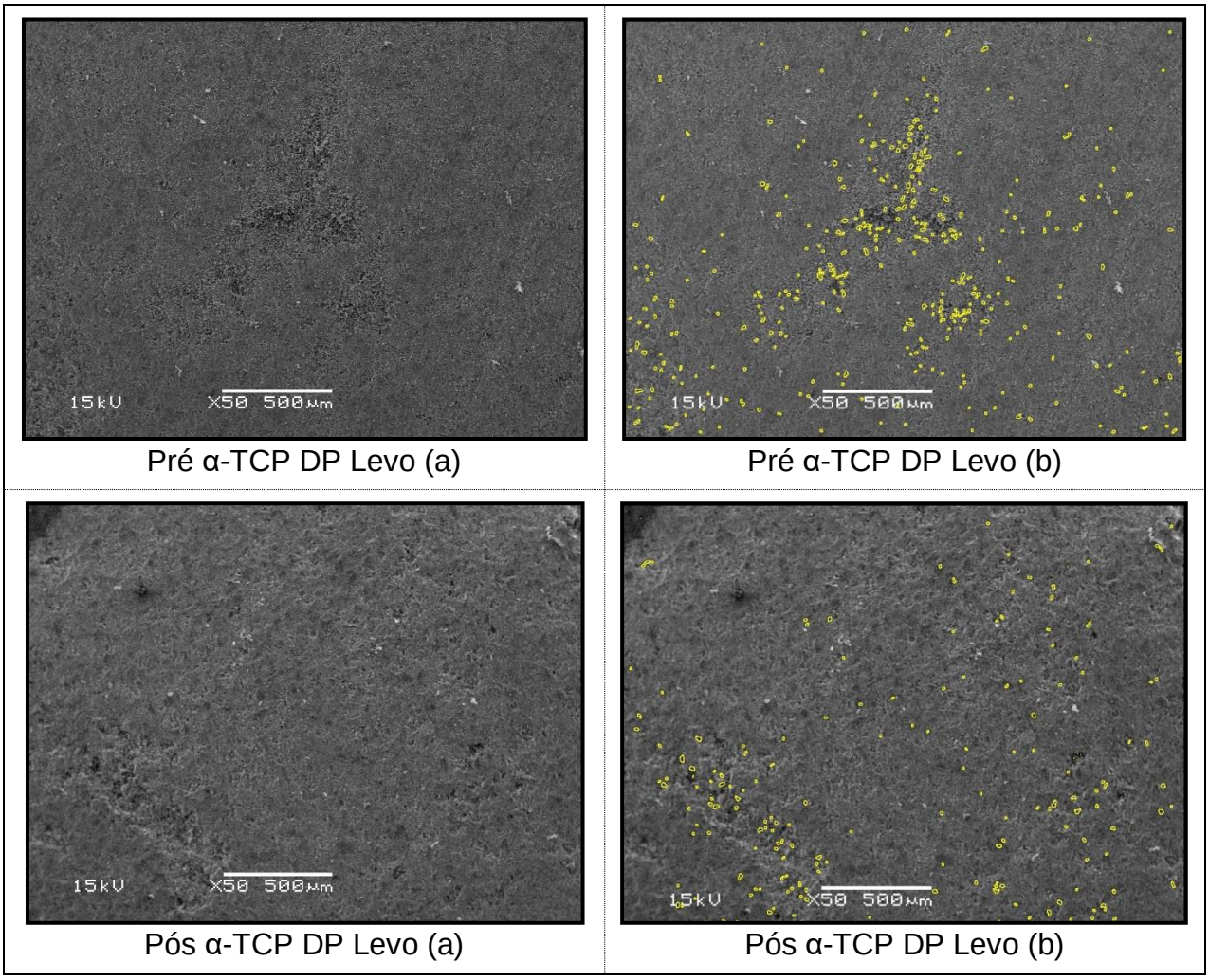
Pré α-TCP Levo (b)



Pós α-TCP Levo (a)



Pós α-TCP Levo (b)



Pré α-TCP DP Levo (a) | Pré α-TCP DP Levo (b)

Pós α-TCP DP Levo (a) | Pós α-TCP DP Levo (b)

Figura 16. Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos conjuntos Pré e Pós-teste, onde (a) representa a figura sem destaque aos poros e (b) representa a mesma figura (a) com destaque aos poros de área entre 70 e 400 µm

Todas as formulações apresentaram porosidade com tamanho adequado a osteocondução (NAGEM, 2006; VAN LENTHE, 2007; ANDERSON, 2008; ROOSA, 2010; ARENS, 2011).

Os tamanhos dos poros estão relacionados à propriedade de biocompatibilidade (KLEIN, 1984). Para que um material seja considerado macroporoso, ele precisa apresentar poros da ordem de diâmetro harvesiano de 50 a 250 µm (HENCH, 2006), sendo que 100 µm seria o tamanho mínimo necessário para a angiogênese.

A figura 17 ilustra a comparação dos grupos dos subconjuntos Pré e Pós-testes, considerando a área da porosidade entre 70 e 400 µm.

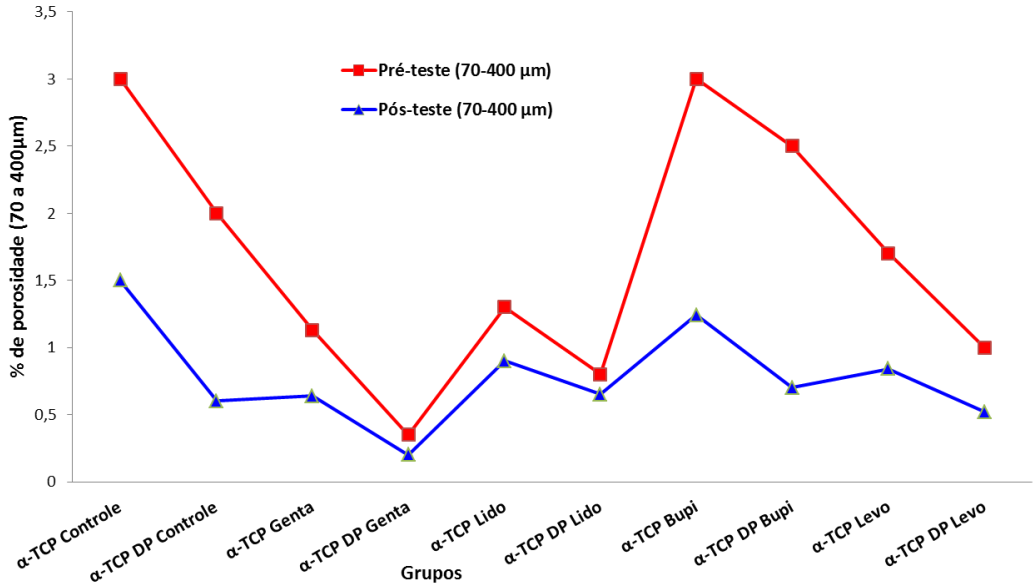


Figura 17. Relação entre o tamanho de poros entre 70 e 400 µm de acordo com os grupos que compõem os subconjuntos Pré e Pós-testes

É possível observar, na figura anterior, que o percentual de poros com tamanho entre 70 e 400 µm encontrados no subconjunto Pós-teste é reduzido se comparado com o subconjunto Pré-teste. Contudo esses poros não desapareceram.

A figura 18 apresenta a diferença entre o percentual de poros total observada nos grupos do subconjunto Pré-teste comparada com a porosidade com tamanho entre 70 e 400 µm encontrada no mesmo subconjunto.

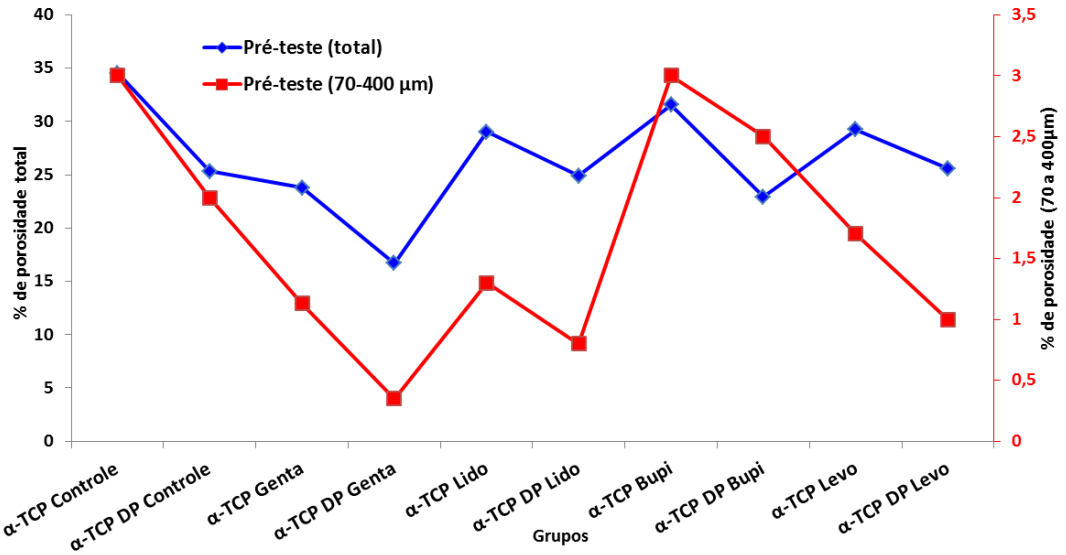


Figura 18. Representação entre a porosidade total e entre 70 e 400 µm de acordo com os grupos que compõem os subconjuntos Pré-testes

Nota-se que o número de poros entre 70 e 400 µm existentes nos grupos que formaram o subconjunto Pré-teste foi maior que nos grupos do subconjunto Pós-teste. Tal fato pode ser explicado pela reação de transformação da hidroxiapatita e o crescimento de cristais no interior dos poros, cujos poros maiores podem diminuir de tamanho ou mesmo sofrerem divisões e poros menores desaparecerem (SANTOS, 2002), alterando, com isso, a fisiologia e anatomia da estrutura.

De acordo com a análise gráfica, os corpos de prova estudados foram constituídos por poros de tamanhos variados, inclusive, o conjunto pós-teste manteve a porosidade na ordem de diâmetro harvesiano, conforme colocado por Hench (2006), ou microcavidades, como menciona Anselme (2000). A manutenção dessa propriedade, apresentada neste estudo, é importante para viabilizar sua aplicação futura *in vivo*.

As microcavidades (1,0 – 100 µm) de dimensões celulares e as nanocavidades (1,0 – 10 nm), com dimensões de proteínas, constituem eventos que ocorrem em curto e longo prazo, respectivamente. As ligações físico-químicas que envolvem forças iônicas e forças de van der Waals são exemplos de eventos em curto prazo, que correspondem à primeira fase da interação entre a célula com o biomaterial – que envolve a adesão e o espalhamento celular; já os eventos de longo prazo envolvem as moléculas biológicas (proteínas e células) – que dependem diretamente do sucesso e da qualidade da primeira fase, porque essa influencia na capacidade de proliferação celular na região de contato com o implante (ANSELME, 2000; JONES, 2001).

Segundo Tsuruga (1997), após estudo realizado com ratos, o tamanho ideal para melhorar a aderência, vascularização, diferenciação e o crescimento celular seria entre 300 e 400 µm. O tamanho necessário de poros para a ocorrência de penetração celular deve ser minimamente entre 30 e 50 µm (VAN LENTHE et al., 2007). Hing et al. (1999) sugerem que a interconectividade entre os poros é mais importante que o seu tamanho. De acordo com Sepulveda (2002), a presença de macroporosidade interconectada permite a incorporação e o crescimento ósseo.

Ainda em relação à avaliação do percentual de porosidade encontrado nas micrografias dos corpos de prova, sem a utilização de filtros que delimitam as áreas, encontraram-se, coincidentemente, valores similares aos encontrados no estudo da Porosidade aparente, conforme figura 19.

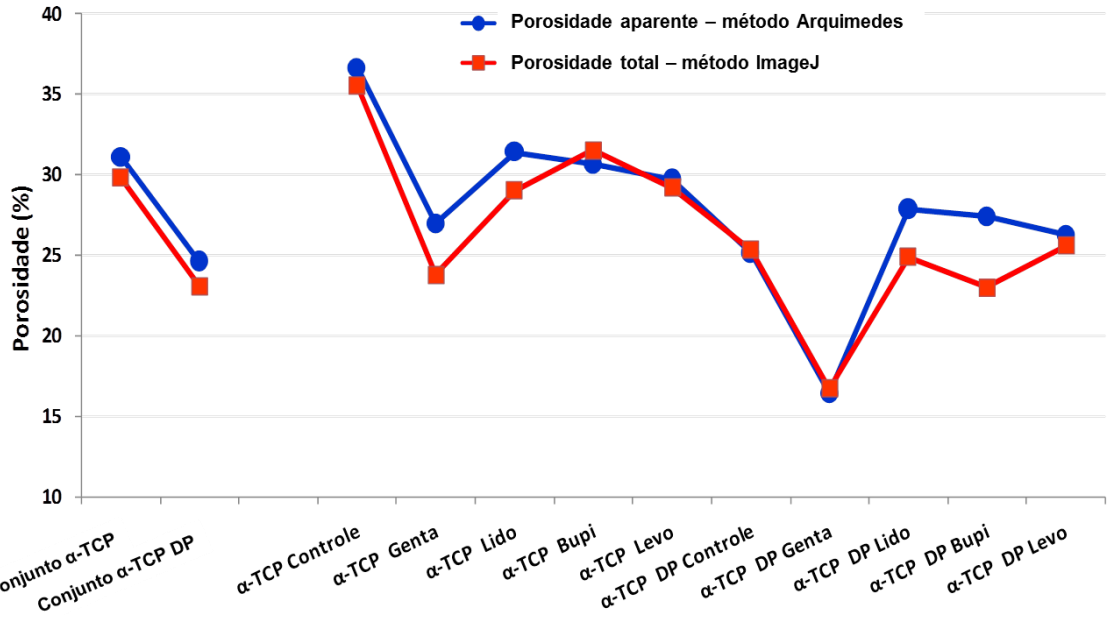


Figura 19. Comparação entre a análise da porosidade aparente pelo método de Arquimedes (linha azul) e o método por análise de imagens pelo software ImajeJ desenvolvido neste estudo (linha vermelha)

Os dados aqui apresentados são válidos somente para este estudo. Portanto, há necessidade de novas aferições a fim de melhor avaliar a metodologia.

A figura 20 apresenta os resultados das análises comparativas que buscaram identificar a ocorrência de diferenças entre as médias das áreas dos poros entre 70 e 400 µm, considerando o nível de significância de <5%, para os subconjuntos e grupos de cimentos estudados.

Neste estudo, apesar da quantidade grande de poros identificados pelo método, os valores médios do tamanho desses poros apresentaram variâncias diferentes, o que impossibilitaria a aplicação de testes paramétricos e, consequentemente, a apresentação gráfica dos resultados analíticos. Dessa forma, a fim de aplicar análise estatística paramétrica, os dados foram normalizados por meio da transformação logarítmica (log 10) (MOORE et al., 2016).

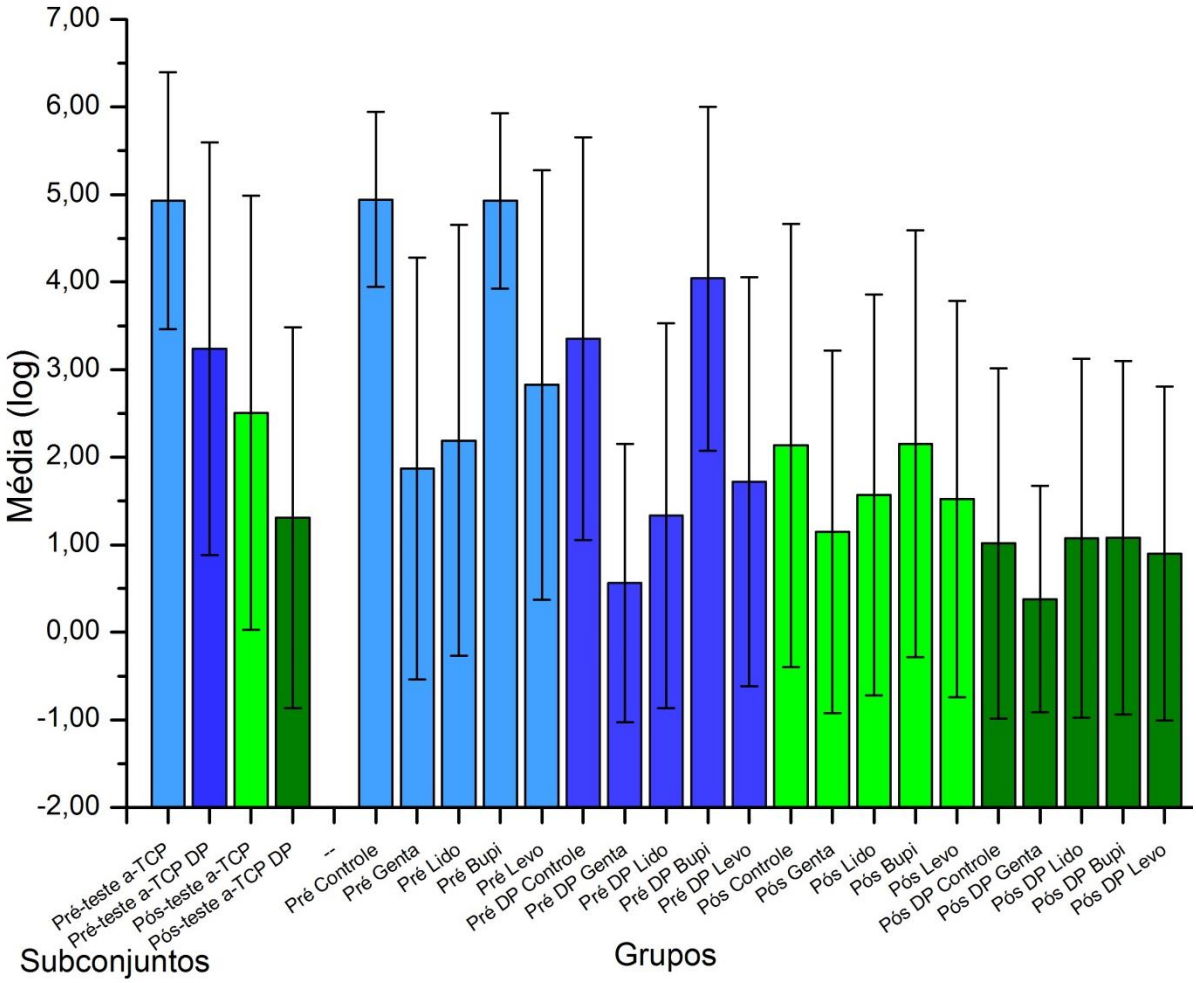


Figura 20. Comparações múltiplas entre médias de poros com tamanho entre 70 e 400 µm (log 10) dos subconjuntos e grupos de estudo. Cada cor trata de um grupo e seu respectivo subconjunto

As comparações de médias, entre os diferentes subconjuntos, não apresentaram diferenças significativas. Com isso, tanto a adição do hidrogel ao cimento α-TCP como a adição de fármacos, além do fato dos corpos de prova terem permanecido por 90 dias sob solução tampão, não foram capazes de alterar, significativamente, a formação de poros entre 70 e 400 µm. Também, não foi observada diferença estatística significativa entre os pares de grupos passíveis de comparação, fenômeno este que também ocorreu para os diferentes grupos, igualmente, sem diferença significativa.

Com isso, é possível inferir que tanto a proporção adicionada de hidrogel ao cimento α-TCP quanto dos diferentes fármacos, em ambos os cimentos, não afetaram, de forma significativa, a formação de poros entre 70 e 400 µm. Tal

resultado é importante porque o cimento de dupla pega preserva o tamanho de poro adequado ao crescimento celular.

O estudo experimental com preenchimento ósseo em coelhos, a partir de cimento α-TCP e albumina desidratada, conforme Miño-Farina (2009), obteve poros variando entre 100 e 300 µm, observando, ainda, a interconectividade entre poros menores que 50 µm. Os resultados desse estudo apontaram uma reposição óssea de 35% em 12 semanas. Já Arens et al. (2011) relatam que poros entre 30 e 250 µm possibilitam a indução da neoformação óssea. A combinação entre a macroporosidade (100 – 500 µm) e a microporosidade (1,0 – 1,5 µm) é ideal para promover a adesão celular.

De acordo com a revisão sobre materiais porosos, realizada por Homsy (1972), foi constatado, *in vivo*, o crescimento de tecidos em poros de tamanho mínimo de 20 µm em biomateriais, sendo que, em poros maiores que 100 µm, observaram-se as formações de estruturas ósseas (calcificação do tecido).

No estudo realizado por Clemow et al. (1981), foi observado que, em poros com tamanho médio entre 20 e 50 µm, os tecidos não calcificaram; em poros com tamanho médio entre 400 e 800 µm, ocorreu o crescimento de tecido fibroso; já os poros com tamanho médio entre 50 e 400 µm, proporcionaram maior taxa de crescimento ósseo.

Dessa forma, os resultados deste estudo corroboram o potencial de aplicação do cimento dupla pega, carregado de fármacos, *in vivo*.

5.6 RESISTÊNCIA MECÂNICA À COMPRESSÃO AXIAL

Para as comparações analíticas foram aplicados os testes não paramétricos, pois as populações de estudo amostradas não apresentavam homocedasticidade entre as variâncias, atribuída às diferenças numéricas, conforme análise dos dados descritivos apresentados no Anexo III. Os resultados das análises estatísticas dos grupos de variáveis estão disponíveis no Anexo IV.

A figura 21 representa os valores de tendência central que descrevem a população estudada quanto à resistência mecânica à compressão axial.

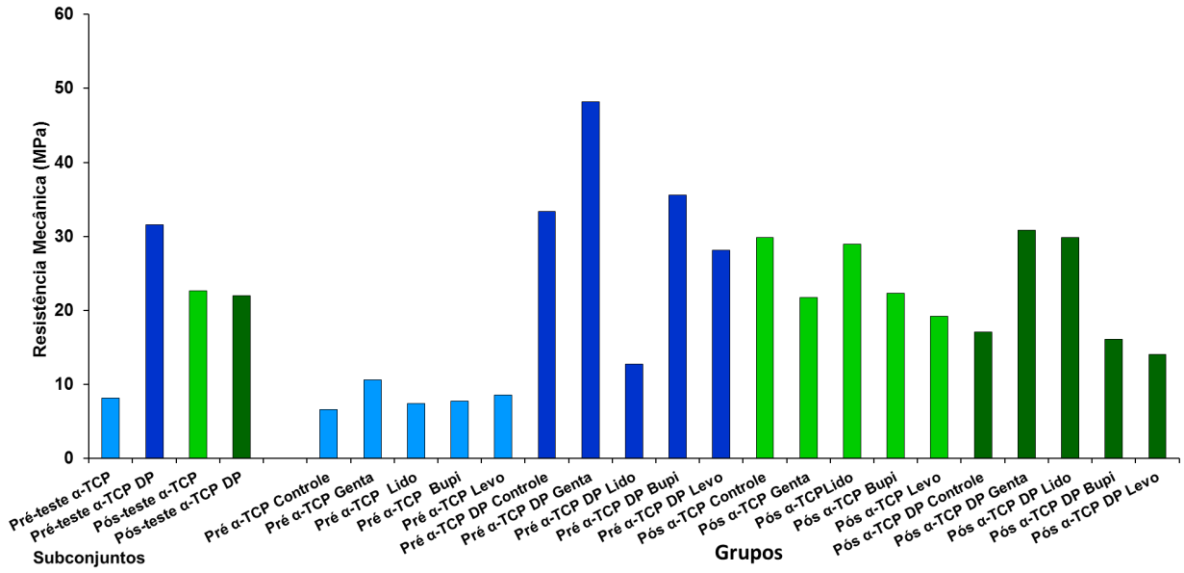


Figura 21. Comportamento em relação à média da resistência mecânica à compressão axial entre os diferentes subconjuntos e grupos estudados. Cada cor trata de um grupo e seu respectivo subconjunto (N= 150)

Na figura precedente nota-se que tanto o hidrogel quanto os fármacos agregaram maior resistência mecânica aos dois conjuntos de cimentos estudados (α-TCP e α-TCP DP). Entretanto, analisando os subconjuntos, percebe-se que, após os ensaios de liberação *in vitro*, o subconjunto Pós-teste α-TCP DP apresentou decremento da resistência mecânica à compressão axial quando comparado ao seu análogo Pré-teste α-TCP DP, sendo essas diferenças significativas (95% IC= 5,029 – 16,25; p= 0,001). Tal diferença é influenciada pelo fármaco sulfato de gentamicina, pois, após estudo de eluição, não foi observada diferença estatística entre os subconjuntos de cimentos Pós-teste α-TCP e Pós-teste α-TCP DP (95% IC= 0 – 5,321; p= 0,464).

De acordo com os dados apresentados na figura 21, a resistência mecânica à compressão axial, entre os grupos, variou entre 5,4 e 47,6 MPa, resultados em conformidade aos encontrados por Beruto et al. (2000), que referem que valor de tensão compressiva para o osso esponjoso da tíbia está entre 1 e 5 MPa e, para o osso esponjoso da cabeça do fêmur, entre 1 e 35 MPa. Esses autores, em seu experimento, adicionaram α-TCP ao PMMA para produção de cimento esponjoso e obtiveram uma tensão compressiva de 24,9 MPa.

De acordo com Huiskes (2000), referindo-se à lei de Wolff (1892), cargas mecânicas de baixa intensidade propiciariam aumento da formação óssea e remodelação. Uma menor resistência mecânica estimula à neoformação óssea nas regiões adjacentes à interface osso/implante, assim, melhorando a osteointegração, consequentemente, reduzindo a perda de massa óssea (FORWOOD, 2001).

Os resultados encontrados para o cimento isento de fármacos (grupo controle) foram similares aos de Santos et al. (1999), que obtiveram valores muito próximos aos deste estudo. Ao comparar os demais grupos constituídos por fármacos com os respectivos grupos controle, observa-se que esses aditivos contribuíram significativamente para o aumento da resistência mecânica ($p < 0,01$), salvo exceção ao grupo constituído pelo anestésico local cloridrato de lidocaína do subconjunto Pré-teste α-TCP, que, apesar de apresentar resistência mecânica superior, esta não foi significativa (95% IC= 0,307 – 1,755; $p= 0,089$).

Para o grupo α-TCP DP Bupi do subconjunto Pré-teste α-TCP DP, apesar de apresentar maior resistência que o respectivo controle, esta não é significativa ($p= 0,246$). O grupo Pré α-TCP DP Controle apresentou resistência mecânica significativamente maior que os grupos Pré α-TCP DP Lido (95% IC= 18,465 – 22, 488; $p< 0,001$) e Pré α-TCP DP Levo (95% IC= 2,422 – 7,707; $p< 0,001$). Tal fato pode estar relacionado a maior porosidade aparente apresentada por ambos os grupos, em relação ao respectivo grupo controle.

As formulações dos cimentos com adição do antibiótico sulfato de gentamicina conferiram a estes, significativamente, maior resistência mecânica ($p< 0,01$). Tal fato converge para os resultados reportados nos estudos de Bohner et al. (1997), cuja resistência mecânica aumentada é atribuída à presença de íons sulfato no antibiótico, os quais se ligam ao cimento por ligações covalentes de van der Waals, diminuindo sua porosidade.

Para o subconjunto α-TCP Pós-teste, os grupos constituídos por fármacos não apresentaram diferença significativa da resistência mecânica comparada ao grupo controle. Entretanto para o subconjunto α-TCP Pós-teste DP, observa-se que, além do grupo Pós α-TCP DP Genta, o grupo Pós α-TCP DP Lido também apresentou resistência mecânica significativamente maior que o respectivo controle. Quanto a lidocaína, como sua liberação ocorreu rapidamente, é possível observar pela imagem do MEV, que houve aumento da formação dos cristais de hidroxiapatita, promovendo, consequentemente, aumento dessa resistência.

Com relação aos anestésicos locais, Giordano et al. (2007) avaliaram a resistência mecânica ao impacto de duas marcas de cimentos ortopédicos acrílicos agregados de duas drogas anestésicas locais (lidocaína e bupivacaína), demostrando que a combinação dos cimentos com os anestésicos locais melhorou as propriedades mecânicas destes, sendo que a bupivacaína apresentou resistência significativamente superior à da lidocaína. Contudo, até a elaboração deste manuscrito, não foram encontrados estudos que investigassem as propriedades mecânicas envolvendo cimento α-TCP adicionado de anestésicos locais.

O subconjunto Pré-teste do cimento α-TCP DP apresentou, de forma significativa, maior resistência mecânica que o subconjunto Pré-teste do cimento α-TCP. Tal propriedade está diretamente associada à diminuição da porosidade aparente, conforme ilustrado na figura 22.

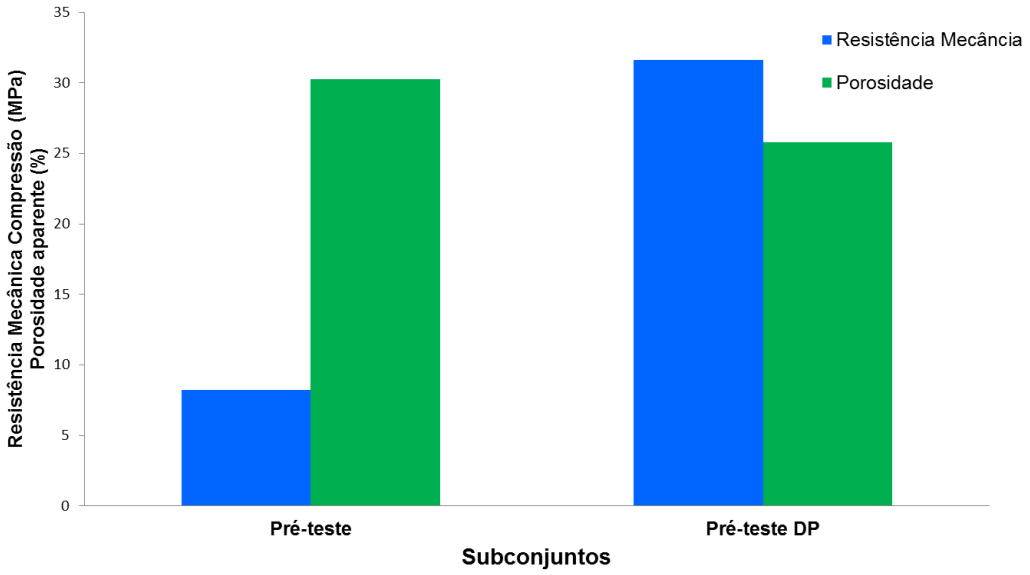


Figura 22. Relação entre resistência mecânica e porosidade aparente para os subconjuntos Pré-teste e Pré-teste DP

A porosidade, a distribuição de tamanho de poros, a presença de defeitos e a homogeneidade ou heterogeneidade do sistema constituem-se nos principais parâmetros que determinam a resistência dos cimentos (SANTOS, 2002).

Segundo Mindess (1985), a resistência de um material é maior, quanto maior for a proporção de pequenos poros, considerando sua porosidade total. A magnitude do campo de intensidade de esforço é reduzida de acordo com a redução do tamanho dos poros, onde essas tensões se concentram (ALFORD; McN, 1981).

Dessa forma, os resultados descritos, neste estudo, para o cimento dupla pega reforçam a ampliação do campo de aplicação do cimento α-TCP.

5.7 LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS ESTUDADOS

5.7.1 Perfil de Liberação *in vitro*

O método analítico por UV-vis foi realizado de acordo com o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, publicado na Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Para a obtenção do perfil de liberação de cada grupo amostral foi necessário estabelecer, para cada fármaco, a curva de calibração por meio da equação da reta e dos coeficientes de determinação (R^2) (MORAIS, 2011), conforme tabela 4.

Tabela 4. Equações da reta e coeficientes de determinação (R^2) para as curvas obtidas (n=3)

Fármaco	Equação da reta	R^2
Sulfato de gentamicina	y= 0,0903x – 0,0001	0,9952
Cloridrato de lidocaína	y= 0,1029x + 0,0659	0,9933
Cloridrato de bupivacaína	y= 0,0767x + 0,0787	0,9992
Cloridrato de levobupivacaína	y= 0,0712x + 0,0624	0,9956

De acordo com a tabela precedente, as curvas analíticas, para todos os fármacos, apresentaram os coeficientes de determinação (R^2) próximos da unidade, portanto, mantendo o princípio da linearidade, em concordância com os critérios estabelecidos pela RE nº 899/2003 da Anvisa, que preconizam valor mínimo de R^2= 0,99 (BRASIL, 2003).

A figura 23 representa os perfis de liberação dos fármacos contidos nos diferentes grupos estudados, em meio tampão fosfato pH 7,0. Essa possibilitou comparar os perfis de liberação entre os dois conjuntos estudados e relacionar cada grupo incorporado pelos diferentes fármacos.

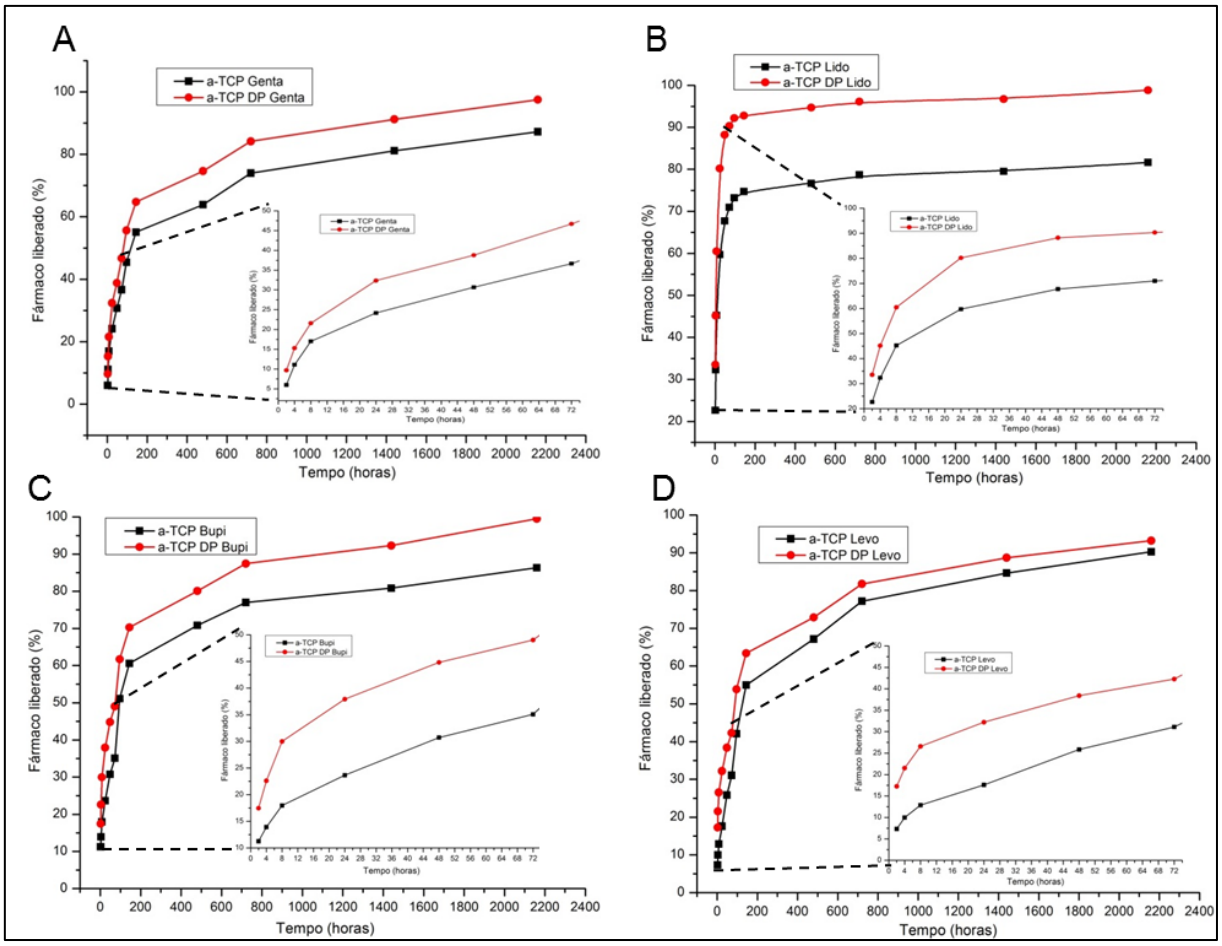


Figura 23. Perfil do percentual acumulado de liberação dos fármacos agregados aos conjuntos cimentos α-TCP (linha preta) e α-TCP DP (linha vermelha) em relação ao tempo. Sendo: gráfico (A) o perfil de liberação do sulfato de gentamicina, (B) do cloridrato de lidocaína, (C) do cloridrato de bupivacaína e (D) do cloridrato de levobupivacaína

Observou-se um perfil de liberação mais acelerado nas primeiras horas, seguido de um perfil sustentado até o final de 90 dias, o que é desejado para a manutenção do índice terapêutico.

Quanto a essa observação – com a suposição do comportamento das formulações *in vivo* –, o sistema seria implantado por meio de uma incisão cirúrgica ou injetado no sítio desejado, em ambos os casos, esperar-se-ia que o antibiótico tivesse maior ação inicial e fosse mantido por um período mais longo devido ao maior risco de infecção compreender às primeiras horas do pós-operatório (KATZUNG, 1998). Da mesma forma para os anestésicos, em que o controle da dor requer maior quantidade de fármacos nas primeiras horas do pós-cirúrgico.

Os grupos de cimentos com fármacos não apresentaram diferenças significativas entre os perfis de liberação (Anova $F(7,88)= 0.133$; $p>0,05$) e concentração (Anova $F(7,88)= 2.180$; $p>0,05$). Entre o tempo e o percentual de

liberação houve correlação negativa (p=0,012; R^2= 0,066), igualmente entre o tempo e a concentração (p=0,020; R^2= 0,056), conforme ilustra a figura 24.

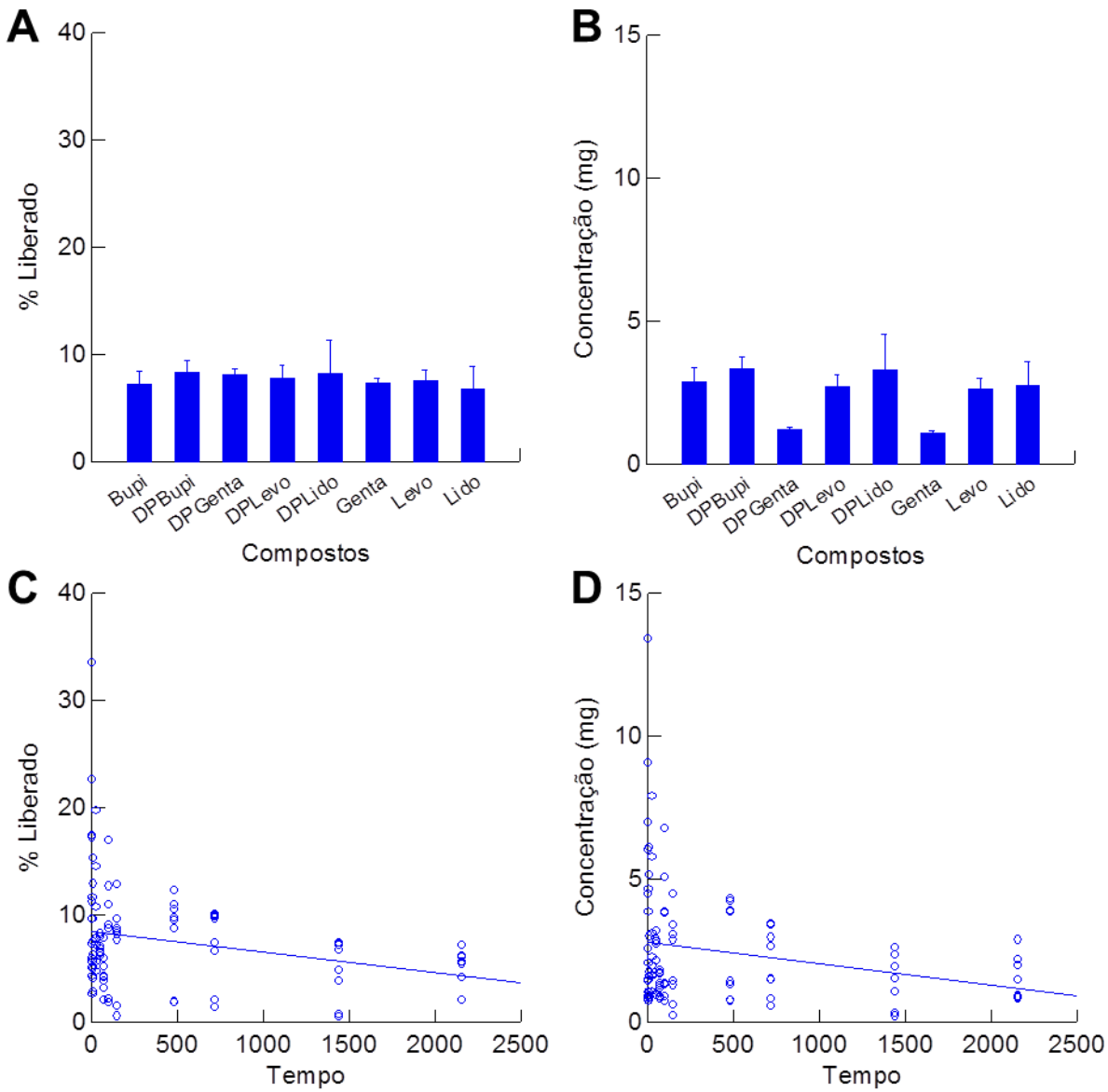


Figura 24. Graficos de regreção linear entre perfil de liberação (%) e concentração (mg) para cada grupo de fármacos contidos nos conjuntos estudados. (A) Diferenças entre o percentual de liberação; (B) Diferenças entre a concentração (mg); (C) Correlação entre o tempo e o percentual de liberação para todos os grupos; (D) Correlação entre o tempo e a concentração (mg) para todos os grupos

O conjunto α-TCP DP apresentou maior perfil de liberação em todas as formulações estudadas. Esse dado evidencia que os os fármacos ficaram retidos no interior da rede polimérica e que o fênomeno de inchamento, característico de sistemas poliméricos de liberação, pode ter colaborado com o aumento desse perfil (Wang, 2002). A correlação (Figuras 24 C e 24 D) demonstra que a maior

quantidade de fármacos foi liberada nas primeiras horas, em todos os grupos de cimento.

No corrente estudo, todos os grupos apresentaram maior liberação nas primeiras 8 horas, sendo que até as primeiras 72 horas ocorreu a liberação de quase 50% dos fármacos, ao final dos 90 dias, observou-se a liberação de mais de 80%, como garantia da qualidade do ensaio. Manadas et al. (2002) colocam que, para a garantia da qualidade do ensaio de dissolução, o tempo deve ser prolongado até que, pelo menos, 80% do fármaco sejam liberados.

Os grupos compostos pelos cimentos agregados do cloridrato de lidocaína, liberaram mais de 80% do fármaco, em conformidade ao perfil de liberação inicial do tipo "*burst*" retratado por Vallet-Regí et al. (2007). Esses autores colocam que é um perfil típico de liberação por difusão, característico de sistemas porosos. De acordo com os resultados da análise da porosidade aparente, os grupos compostos pelo fármaco (α-TCP Lido e α-TCP DP Lido) apresentaram maior porosidade aparente, o que pode explicar o perfil de liberação encontrado. Os demais fármacos, apresentaram um perfil de liberação mais lento e constante.

Glautier et al. (2010) utilizaram uma matriz de cimento fosfato de cálcio deficiente em cálcio associada, distintamente, a um analgésico e ao anestésico local lidocaína e observaram que o tempo de liberação, *in vitro,* variou de 1 a 4 dias para o cloridrato de lidocaína, ou seja, deu-se um perfil de liberação acelerado, similar ao que foi detectado neste estudo, em que 80% da lidocaína foi liberada em até 96 horas.

Bond et al. (2004) estudaram a liberação, *in vitro,* de quatro anestésicos locais (bupivacaína, lidocaína, tetracaína e prilocaína) incorporados a cinco cimentos acrílicos distintos e concluíram que os anestésicos locais foram liberados, lentamente, durante 72 horas, sendo que as maiores taxas foram observadas nas primeiras horas. As taxas de liberação variaram entre os diferentes fármacos, porém o principal fator limitante da velocidade de liberação, segundo os autores, "pareceu ser o cimento". Esses autores salientam, ainda, antes de um estudo *in vivo,* que é importante investigar se a incorporação dos fármacos, em determinadas concentrações, comprometeria, entre outras, as propriedades mecânicas dos cimentos. No corrente estudo, as concentrações testadas não comprometeram as propriedades mecânicas dos cimentos testados.

Para o fármaco sulfato de gentamicina, os resultados foram condizentes aos obtidos por Azi et al. (2010) e Padilla (2001), cuja maior taxa de liberação deu-se nas primeiras 24 horas, seguindo por uma liberação mais lenta. Neste estudo, os corpos de prova testados, liberaram os fármacos de forma continuada, em conformidade aos resultados de Padilla (2001).

Portanto, ambos conjuntos liberaram os fármacos em função do tempo. Comportamento característico de sistemas implantáveis de liberação de substâncias ativas, apontando para a viabilidade de utilização dos cimentos α-TCP e α-TCP DP como um sistema de liberação continuada de fármacos, e, assim, cumprindo sua função na manutenção do índice terapêutico no organismo (GRISTINA; COSTERTON, 1985; FOLKMAN, 1990; KONG, et al., 2000; STENGEL et al., 2001; OGAWA; PLEPIS, 2002; LAZZARINI et al., 2004; CIRIMINNA, et al., 2011).

5.7.2 Cinética de liberação de fármacos

Um dos objetivos deste estudo foi elucidar o mecanismo de transporte dos fármacos a partir dos dois sistemas propostos (conjuntos: α-TCP e α-TCP DP). Quatro modelos diferentes foram utilizados para ajustar os dados experimentais obtidos nos testes de liberação *in vitro*, incluindo de Peppas-Sahlin, Lindner-Lippold, Korsmeyer-Peppas e Higuchi. De acordo com Aragón (2012), esses modelos são válidos apenas para os primeiros 60% da liberação dos fármacos devido ao efeito de *burst* (liberação inicial rápida), relacionado com a difusão das moléculas de fármaco localizada na superfície das amostras. Os resultados dessas análises são elencados na tabela 5.

Tabela 5. Constantes de liberação e coeficientes de correlação das equações matemáticas aplicadas na liberação dos sistemas estudados. Com destaque ao modelo que melhor explicou a cinética encontrada neste estudo

Formulação	Modelo	K1 (DP)	K2 (DP)	n (DP)	R^2
α-TCP Genta	**Peppas e Sahlin**	**7,7 (± 1,128)**	**0,17 (±0,05)**	**0,40 (±0,029)**	**0,985**
	Lindner e Lippold	67,3 (± 34,806)	0,11 (±0,037)	68,04(±37,563)	0,984
	Korsmeyer e Peppas	8,8 (±1,624)	-	0,33 (± 0,021)	0,939
	Higuchi	3,7 (± 0,223)	-	-	0,797

α-TCP DP Genta	**Peppas e Sahlin**	**8.6 (± 1,349)**	**0,22 (± 0,078)**	**0,37 (± 0,025)**	**0,992**
	Lindner e Lippold	137,8 (± 87,843)	0,07 (± 0,034)	137 (± 90,654)	0,985
	Korsmeyer e Peppas	8,5 (± 2,021)	-	0,41 (± 0,02)	0,99
	Higuchi	5,7 (± 0,291)	-	-	0,969
α-TCP Lido	**Peppas e Sahlin**	**18,7 (± 3,817)**	**1,3 (± 0,751)**	**0,51 (± 0,026)**	**0,987**
	Lindner e Lippold	51278 (±43512400)	0 (± 0,133)	51249 (±43512400)	0,831
	Korsmeyer e Peppas	21,7 (± 4,713)	-	0,30 (± 0,022)	0,951
	Higuchi	11,5 (± 0,531)	-	-	0,682
α-TCP DP Lido	**Peppas e Sahlin**	**25,8 (±5,276)**	**2,1 (± 1,222)**	**0,54 (± 0,025)**	**0,999**
	Lindner e Lippold	60994 (±63900800)	0 (±0,149)	60951 (±63900800)	0,765
	Korsmeyer e Peppas	28,7 (±6,09)	-	0,33(±0,021)	0,974
	Higuchi	18,9 (±0,699)	-	-	0,758
α-TCP Bupi	**Peppas e Sahlin**	**8,2 (±1,1486)**	**0,2 (±0,074)**	**0,41 (±0,034)**	**0,969**
	Lindner e Lippold	75,63(±75,065)	0,1 (±0,068)	74 (±80,044)	0,951
	Korsmeyer e Peppas	13,34 (±2,254)	-	0,25 (±0,026)	0,928
	Higuchi	4,9 (±0,259)	-	-	0,946
α-TCP DP Bupi	**Peppas e Sahlin**	**15,8 (±1,619)**	**0,64 (±0,128)**	**0,33 (±0,022)**	**0,983**
	Lindner e Lippold	136,8 (±118,928)	0,07 (±0,043)	127,7 (±119,307)	0,979
	Korsmeyer e Peppas	20,72 (±2,056)	-	0,21 (±0,016)	0,957
	Higuchi	6,6 (±0,349)	-	-	0,744
α-TCP Levo	**Peppas e Sahlin**	**5,33 (±0,962)**	**0,08 (±0,029)**	**0,45 (±0,033)**	**0,981**
	Lindner e Lippold	34,555 (±21,128)	0,173 (±0,057)	35,65 (±25,317)	0,968

	Korsmeyer e Peppas	6,2 (±1,667)	-	0,40(±0,027)	0,940
	Higuchi	3,6 (±0,197)	-	-	0,903
α-TCP DP Levo	**Peppas e Sahlin**	**13,52 (±1,502)**	**0,49 (±0,101)**	**0,33 (±0,025)**	**0,983**
	Lindner e Lippold	50,45 (± 30,594)	0,13(±0,048)	39,88 (±33,934)	0,975
	Korsmeyer e Peppas	12,7 (±1,623)	-	0,31 (±0,015)	0,948
	Higuchi	5,6 (±0,299)	-	-	0,789

Conforme essa tabela, analisando os valores dos coeficientes nela determinados, o modelo que melhor descreve o mecanismo de liberação dos fármacos, pelos sistemas propostos, foi o modelo de Peppas-Sahlin (Figura 25).

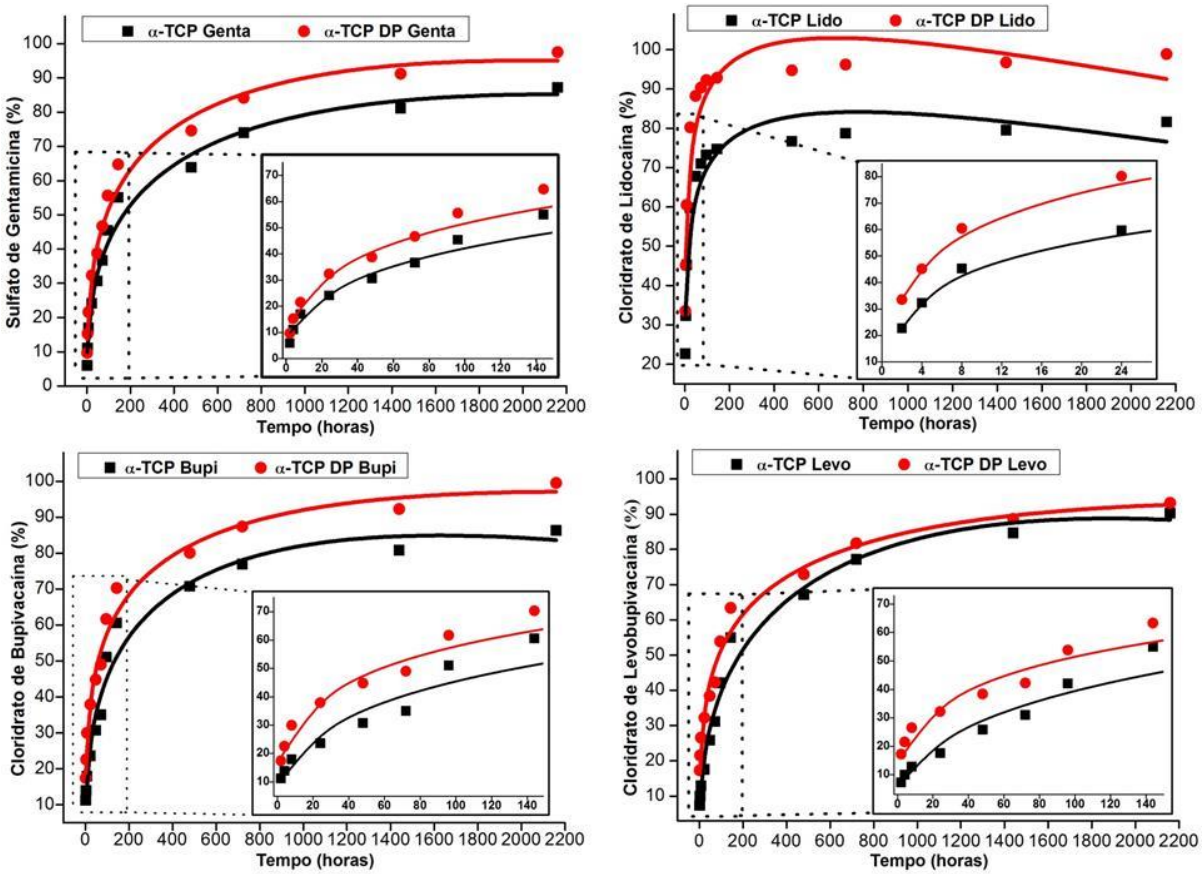


Figura 25. Perfil de liberação dos fármacos estudados de acordo com o modelo de Peppas-Sahlin. A linha contínua representa o modelo matemático que identifica o mecanismo de liberação, os pontos constituem o percentual de liberação em função do tempo. A cor vermelha corresponde aos sistemas formados pelos conjuntos de cimento α-TCP DP; e a cor preta, aos sistemas formados pelos conjuntos de cimento α-TCP. O gráfico menor representa 60% da liberação

Para todas as formulações, o modelo Peppas-Sahlin foi o que forneceu melhor descrição estatística dos dados experimentais. Sendo que, neste modelo, resultados de “n” foram bastante semelhantes aos apontados para amostras cilíndricas, variando entre 0,33 e 0,46 (RITGER, 1987), com exceção do grupo constituído pelo fármaco lidocaína, cujos valores de “n” variaram ente 0,24 e 0,26, o que segue um perfil de liberação similar ao observado nos estudos de Vallet-Regi (2007), quando grande quantidade do fármaco foi liberada rapidamente, seguida de uma taxa de liberação mais lenta. Esse tipo de liberação pode ser útil quando se deseja utilizar uma dose de ataque, ou seja, um efeito rápido, como, por exemplo, o uso de antibiótico para combater focos infecciosos ou a utilização de anestésicos locais para amenizar dor aguda pós-operatória.

Irbe et al. (2012) incorporaram 35 mg de lidocaína por g de cimento α-TCP e constataram, *in vitro*, que o fármaco teve maior liberação nas primeiras 6-8 horas; e uma quantidade residual foi liberada gradualmente até 6 dias. Similar ao encontrado neste estudo para o mesmo fármaco.

O conjunto de cimento dupla pega, carregado com os fármacos estudados, apresentou maior taxa de liberação desses fármacos. Portanto, a fase líquida do conjunto α-TCP DP, constituída principalmente pela acrilamida (10% da quantidade de cimento), pode ter se comportado como um agente de transporte, similar a um plastificante em sistemas poliméricos, dessa forma, favorecendo a difusão do fármaco através da matriz do conjunto α-TCP DP, visto que a velocidade de degradação da matriz dos cimentos é muito menor que a velocidade de liberação dos fármacos (GINEBRA et al., 2006).

Segundo Wang (2002), a reticulação (formação de ligações cruzadas) e a adição de plastificantes são formas que atuam no controle de liberação de fármacos através de uma matriz polimérica. De acordo com o aumento do grau de reticulação, diminui o movimento das cadeias poliméricas e o volume livre, e, por conseguinte, a taxa de difusão do fármaco. Entretanto, os agentes plastificantes são capazes de interporem-se entre as cadeias poliméricas, com isso, diminuindo as interações intramoleculares de forma a aumentar o volume livre e a difusão do fármaco (MARTIN, 1993).

Conforme Manadas et al. (2002), para sistemas controlados pelo mecanismo de difusão, o fármaco pode estar revestido ou incorporado por uma membrana ou matriz, onde o soluto difunde-se por estas e dissolve o fármaco, que, por sua vez, difunde-se para fora do biomaterial. Diante de tal explicação é possível que, com mais intensidade para os cimentos dupla pega, a manutenção de poros entre 70 e 400 μm, apesar do menor percentual de absorção de líquido (fármacos com baixa solubilidade no querosene), da menor porosidade aparente e do menor número de poros evidenciados para este conjunto, possa ter favorecido maior concentração das moléculas dos fármacos nesses poros, que, de acordo com os dados da porosidade aparente, provavelmente, estavam concentrados na superfície dos corpos de prova, e isso, sendo as moléculas dos fármacos altamente solúveis à solução tampão fosfato, explicaria a elevação dessa taxa de liberação em relação ao conjunto isento do hidrogel. De acordo com Arcos et al. (2009), o tamanho de poros bem-definidos é um fator importante para a liberação.

Costa (2002) explica que o valor de *n* caracteriza os diferentes mecanismos de liberação de acordo com a geometria do sistema, onde, no caso de cilindros, $n = 0,45$ para a difusão Fickiana e valores de $n > 0,45$ até 0,89 segue um modelo não Fickiano.

Os valores de *n* entre 0,24 e 0,46, em ambos os conjuntos, sugerem que o mecanismo de liberação que melhor explica os resultados encontrados esteja relacionado aos de difusão Fickiana. Contudo, conforme Vallet-Regi (2007), também, pode estar associado ao mecanismo de transporte anômalo, ou seja, de dissolução por relaxamento das cadeias poliméricas ou intumescimento.

Os parâmetros estimados por meio da aplicação do modelo de Peppas-Sahlin permitem, ainda, identificar a contribuição de cada mecanismo no processo de liberação, ou seja, é possível estimar a relação entre a contribuição de relaxamento “R” e a contribuição difusional “F”. Para isso, foram aplicadas as equações 10 e 11 (PEPPAS; SAHLIN, 1989), cujos resultados estão graficamente representados na figura 26.

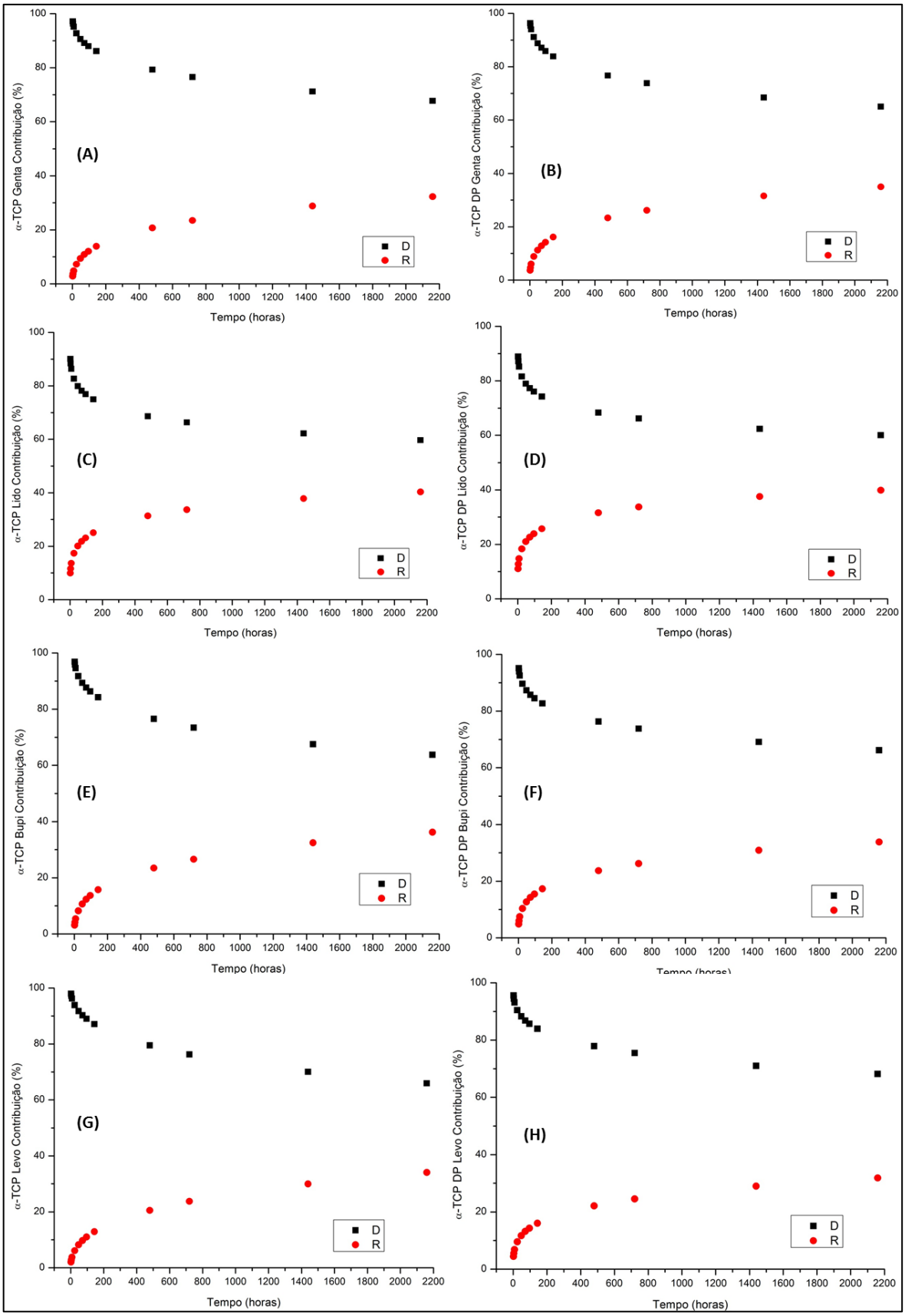


Figura 26. Contribuição (%) dos mecanismos de difusão Fickiana (D) e relaxamento das cadeias poliméricas (R), de acordo com o grupo estudado em função do tempo

De acordo com a figura 26, o mecanismo de liberação foi semelhante para todos os grupos experimentais, predominando a difusão Fickiana e uma pequena contribuição do relaxamento das cadeias. Desde o início do processo, o mecanismo de difusão Fickiano apresentou maior contribuição, que foi diminuindo no decorrer do tempo, porém manteve-se como mecanismo principal.

Tais achados são similares aos trabalhos de Demarchi (2014), que testou sistemas à base de nanogel magnético para compostos meleimidicos com atividade antitumoral. Essa autora relatou o mesmo mecanismo para um de seus sistemas, testados em solução tampão fosfato pH 5,0 e 7,4.

O comportamento da cinética observado neste estudo assemelhou-se ao experimento de Aragón (2012), que encontrou os mesmos mecanismos para a liberação do antibiótico cefalexina a partir de um sistema composto por HAP-200, CaCO3 e o polímero POVIAC. De acordo com Ginebra et al. (2006), o processo de difusão predomina para as matrizes dos cimentos fosfato de cálcio.

Neste estudo, o principal mecanismo envolvido foi a a difusão Fickiana, comportamento esperado já que os conjuntos estudados são porosos. Concomitante a esta difusão, observa-se, também, o mecanismo de liberação de transporte Caso II, ou relaxamento das cadeias, perfeitamente compreensível para o sistema de cimento dupla pega, o qual possui poliacrilamida em sua formulação. A presença do hidrogel explicaria o maior perfil de liberação encontrado neste sistema. Contudo para o sistema isento de hidrogel encontramos o mesmo mecanismo envolvido. Esse fato dá indícios da ocorrência de ligação fracas entre o cimento e os fármacos, que pode ser similar ao já descrito em literatura para a gentamicina, onde os íons sulfato se ligam ao cimento por ligações de van der Waals. Neste caso, para os anestésicos locais estudados, assim como para o antibiótico, há indícios da presença destas ligações fracas, as quais estariam relacionadas a solubilização do cimento, que “simularia” a relaxação das cadeias e explicaria o modelo encontrado.

Portanto, para este estudo, o mecanismo de liberação dos fármacos, a partir dos sistemas propostos, pode ser considerado como o resultado da contribuição conjunta entre o transporte Caso II com predominância da difusão Fickiana.

5.8 RESULTADOS COM TESTES COM ESPETROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

Os resultados a seguir expostos têm o objetivo de propor a impedância eletroquímica como um novo método de avaliação da concentração de fármacos em meios líquidos. Trata-se de um estudo inicial que deve ser aprimorado.

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é utilizada para avaliar mudanças na microestrutura de cimentos (tamanho das partículas, tempo de pega) (BESSIÈRE et al., 1995; HOEPFNER; CASE, 2002; LIU et al., 2003) com o intuito de caracterização de efeitos causados por aditivos em sua formulação, bem como sua exploração como uma técnica não destrutiva (DESPAS et al., 2013). Contudo o uso da técnica em sistemas de liberação à base de cimento α-TCP constitui um campo a ser explorado. Portanto este estudo testou a liberação do fármaco sulfato de gentamicina por meio da técnica proposta.

No estudo realizado foi possível observar mudança na resistência de corrente entre as soluções contendo os corpos de prova de cimento α-TCP controle e os corpos de prova α-TCP Genta. A figura 26 ilustra o espectro de impedância da amostra do grupo controle (corpo de prova sem adição do fármaco).

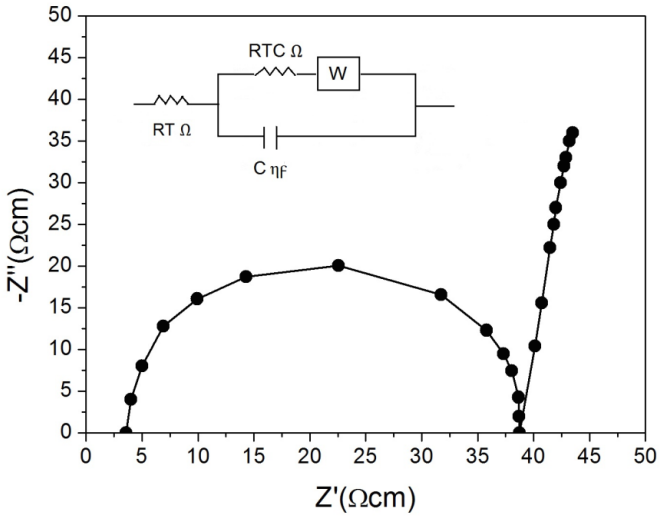


Figura 26. Apresentação do circuito equivalente R (RC) (RC) e do Diagrama de Nyquist da solução proveniente do grupo controle

O espectro contém dois processos separados, correspondentes a dois subcircuitos (BOUKAMP, 1989). O primeiro subcircuito é uma resistência elétrica pura que pode ser atribuída à resistência elétrica da solução contendo o corpo de

prova sem o fármaco (RTΩ). Na continuação dessa RT, observa-se um semicírculo aplanado que pode ser descrito a um subcircuito com uma resistência associada à transferência de cargas elétricas (RTCΩ) durante a realização das medidas, que estão associadas ao componente pseudocapacitivo que engloba a impedância de Warburg (Zw), representada, na figura 26, pelo circuito de Randles (BRUCE, 1995). O componente pseudocapacitivo é atribuído à distribuição das cargas elétricas nas interfases promovendo a capacitância da dupla camada elétrica (CɳF).

A figura 27 representa os resultados dos corpos de prova que continham o fármaco sulfato de gentamicina nos seis tempos estudados (dias: 1, 2, 3, 4, 8 e 15), indicando que os circuitos equivalentes permaneceram iguais ao anterior. Esse fato indica que os processos eletroquímicos dos corpos de prova não foram alterados, fundamentalmente, porque os subcircuitos obtidos se associaram a processos eletroquímicos típicos, com formação da dupla camada elétrica entre as interfases com os eletrodos.

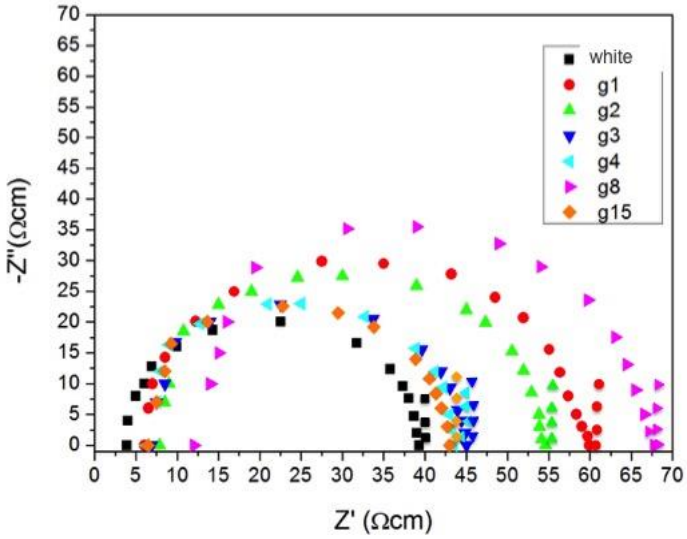


Figura 27. Diagrama de Nyquist com comparação das soluções provenientes dos corpos de prova do grupo controle e dos corpos de prova adicionados de SG em relação aos diferentes tempos de coletas (white= grupo controle, g1=dia 1, g2=dia 2, g3=dia 3, g4= dia 4, g8= dia 8 e g15= dia 15)

A diferença observada em relação aos valores de resistência pode ser atribuída às transferências de elétrons das reações eletroquímicas, característica de reações de oxirredução, que, por sua vez, dependem de fatores relacionados ao processo cinético, ou seja, à velocidade de transferência dos elétrons através da superfície do eletrodo, da capacitância interfacial e das limitações de transporte de massa (CARVALHO et al., 2006), variando de acordo com o aumento ou diminuição

da concentração do fármaco liberado pelo corpo de prova cimento α-TCP Genta na solução.

No tempo de liberação do fármaco, deu-se a diminuição das resistências ($R_{tampão}$ e RTC) do sistema, indicando que o fármaco, que antes aumentava a resistência, começou a diminuí-las em função do tempo (dias).

A figura 28 representa o processo de diminuição das resistências $R_{tampão}$ (R1) e RTC (R2) ao longo do tempo (dias) de liberação do fármaco, sendo identificado o desvio padrão de ± 1,49 Ω para R1 e ± 9,66 Ω para R2 entre os seis sistemas estudados. No dia 8, observou-se uma importante mudança no processo de liberação devido ao aumento das resistências. Esse aumento é atribuído ao fato de que a amostra somente foi coletada quatro dias após a coleta do quarto dia, ou seja, ainda, existia grande quantidade de fármaco no corpo de prova que provocou aumento da concentração do fármaco na solução tampão.

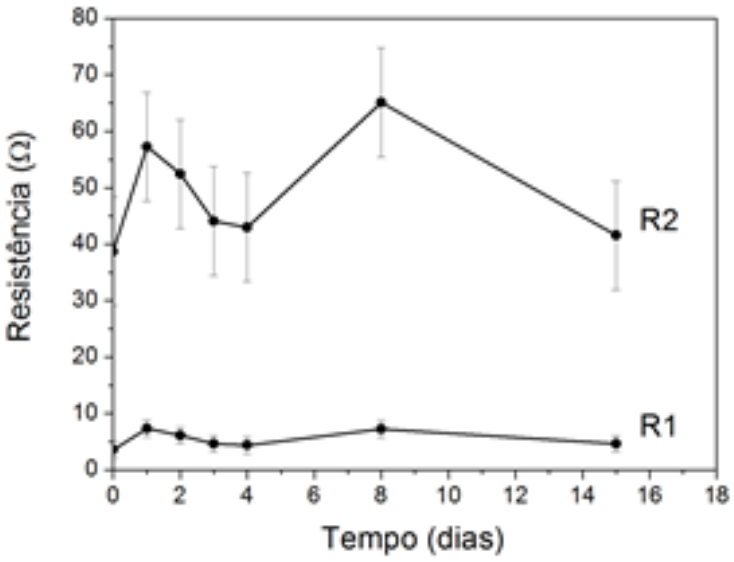


Figura 28. Relação entre a Resistência (Ω) em função do tempo (dias) de estudo. A linha R1 representa a Rtampão e a linha R2 a resistência do sulfato de gentamicina

Pôde-se observar que a presença do fármaco modificou os valores da RT e RTC. Assim, podemos referir que ocorreu uma redução dessas resistências devido à presença do antibiótico, indicando substancial concentração de íons móveis no sistema eletroquímico. Durante a liberação do fármaco, deu-se a diminuição das resistências (RT RTC) do sistema, indicando a concentração do fármaco que, antes aumentava a resistência, começa a diminuí-las em função do tempo (dias). Tais evidências podem ser influenciadas pela presença de oxigênio no meio.

CONCLUSÃO

Este estudo permitiu inferir que a metodologia construída e aplicada foi efetiva para afirmar que tanto o cimento α-TCP quanto o cimento α-TCP de dupla pega foram competentes para armazenar e transportar os fármacos testados, e, portanto, podem funcionar como Sistema de Liberação Controlada de Fármacos, *in vitro*.

O tamanho médio das partículas do pó de cimento α-TCP manteve a relação líquido-pó necessária ao preparo da pasta cimentícia de consistência adequada à obtenção dos corpos de prova. O que possibilitou, a manutenção da porosidade dos cimentos testados.

De acordo com os difratogramas, tanto a fase líquida (hidrogel acrílico), que constitui os cimentos α-TCP dupla pega, quanto o percentual utilizado de fármacos nos dois conjuntos de cimentos, não impediram a formação das fases características dos cimentos α-TCP, mantendo a reação de precipitação da CDHA, as quais foram comprovadas por meio das imagens fotomicrografadas pelo MEV.

A estrutura química dos cimentos α-TCP e α-TCP dupla pega não foi alterada pelos fármacos, conforme as espectrofotometrias de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier. Não sendo possível identificar grupos funcionais relacionados aos fármacos estudados.

A Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente, Absorção de líquido sofreram influência, tanto pela presença dos fármacos, quanto pelo hidrogel que constituíram os conjuntos de cimentos.

O *software ImageJ* permitiu dimensionar e quantificar a porosidade dos sistemas estudados, admitindo analogia com os valores da porosidade aparente.

O antibiótico sulfato de gentamicina agregou maior resistência mecânica ao cimento α-TCP, sendo este aumento intensificado no cimento dupla pega.

A presença do hidrogel (acrilamida e poliacrilato de amônia) aumentou, de forma significativa, a resistência mecânica para os cimentos α-TCP de dupla pega.

Ambos os cimentos foram capazes de armazenar os fármacos e liberá-los apenas após a imersão na solução fisiológica. Todos os grupos, constituídos pelos corpos de prova, apresentaram maior liberação nas primeiras horas do início do experimento *in vitro*. Após as primeiras horas, o perfil de liberação foi mais lento, mantendo-se até o final dos 90 dias de estudo.

O modelo matemático Peppas-Sahlin foi o mais adequado para explicar o mecanismo envolvido na cinética de liberação dos fármacos, sendo o processo de difusão Fickiana predominante sobre o relaxamento de cadeias (Caso II). O conjunto composto pelo cimento dupla pega apresentou o perfil de liberação mais elevado que o conjunto α-TCP, explicado pela presença do hidrogel acrílico neste sistema. Para o sistema isento de acrilamida, similar as ligações covalentes que acontecem entre este e o sulfato de gentamicina, o mecanismo identificado dá indícios da presença de ligações fracas entre os anestésicos locais e o cimento α-TCP, onde, o transporte Caso II seria simulado pela solubilização do cimento.

Para os ensaios de EIS, o método proposto permitiu avaliar diferenças de concentração do fármaco nas soluções testadas em relação aos tempos de coleta, então, apontando para a viabilidade de utilização do método para a construção de um modelo para avaliar a liberação de fármacos por meio da técnica de EIS.

Perante a “corrida tecnológica” hodierna, é desafiador à vigilância sanitária fiscalizar e regular novas tecnologias à medida que surgem. A prática sanitária requer conhecimento aprofundado e fundamentado na especificidade de cada tecnologia. Por sua vez, os “desenvolvedores” destas tecnologias, deixam a desejar no quesito vigilância sanitária. Ora, é esperado que o pesquisador, quem mais conhece a própria pesquisa, tenha condições para apontar as bases que orientam a determinação de indicadores ao controle sanitário. Para tanto, é necessário, também, que esse pesquisador adquira conhecimentos da área sanitária.

Com tal perspectiva, a parceria entre as agências reguladoras/fiscalizatórias e as instituições de ensino e pesquisa compõe uma das ferramentas que poderá contribuir à superação desse paradigma, somada à proposição de qualificação diversificada ao quadro funcional da vigilância sanitária. Outra ferramenta seria o fomento e incentivo à introdução da arte regulatória/sanitária nas instituições de ensino, seja nos níveis técnicos seja nos superiores, que são responsáveis pela construção e conscientização de um cidadão crítico.

A partir da prática experimental, este trabalho propiciou a aquisição de conhecimentos sanitários envolvidos no desenvolvimento de uma nova tecnologia. Com isso, espera-se contribuir com o exercício fiscalizatório no Posto de Vigilância Sanitária em Portos Aeroportos e Fronteiras de Porto Alegre, na Coordenação de Portos Aeroportos e Fronteiras do Rio Grande do Sul, na Anvisa e no SNVS.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar possíveis ligações entre os fármacos, cimento e hidrogel acrílico;
- Testar os sistemas com outras percentagens de fármacos;
- Aplicar o estudo *in vivo*;
- Testar os sistemas de cimentos e a metodologia em processo de biofabricação com impressão 3D;
- Aprimorar a técnica de EIS para avaliação da cinética de liberação de fármacos em tempo real;
- Aplicar a metodologia com outros fármacos;
- Estimular, no Labiomat, a implantação, na rotina, de avaliação de indicadores ou parâmetros regulatórios envolvidos no desenvolvimento de novas tecnologias à saúde.

REFERÊNCIAS

ABUKAWA, H. *et al*. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental Clinics of North America,** v.50, n.2, p.205-216, 2006.

AITH, F. **Curso de Direito Sanitário**: a proteção do direito à saúde no Brasil. São Paulo: Quartier Latin, 2007.

ALFORD, N.; McN, A. **Theorethical argument for the existence of high strength cement pastes**. Cem. Concr. Res., v. 11, p. 605-610, 1981.

ALVES, H. L. R. **Cimento ósseo de fosfato tricálcico:** síntese e influência de aditivos na sua injetabilidade. 2005. 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to biomaterials, **PubMed.gov**, Eua, Semin Immunol, v. 20(2), p.86-100, April 2008.

ANSEL, H. C.; ALLEN, L.; POPOVICH, N. G. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. **Artmed**, 9 ed., 2013.

ANSELME, K. Osteoblast Adhesion on Biomaterials. **Biomaterials**, **PubMed.gov**, Eua, Semin Immunol. v. 21, p. 667-668, Abril 2000.

ARAGÓN, J.; BRIZUELA, N.G.; GONZÁLEZ, R. Perfil de liberación controlada de ASA en biomateriales compuestos de hidroxiapatita -POVIAC. **Revista CENIC Ciências Químicas**, v. 37, n.3, p.179-118, 2006.

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.

ARAUJO, D. R. *et al*. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Revista Brasileira de Anestesiologia** (Impresso), Brasil, v. 53, p. 663-671, 2003.

ARAÚJO, D. R. *et al*. Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25): efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo ciático em camundongos. **Rev. Bras. Anestesiol,** Botafogo, RJ, v. 55, n. 3, p. 316-328, 2005.

ARCOS, D. *et al*. Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery. **Chemistry of Materials**, Washington, DC, v. 21, n. 6, p. 1000-1009, 2009.

ARENS, D. *et al*. Bone marrow modified acrylic bone cement for augmentation of osteoporotic cancellous bone. **The Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. v. 4, n. 8, p. 2081-9, Nov. 2011.

ASTM C20-00 (2015), Standard Test Methods for Apparent Porosity, Water Absorption, Apparent Specific Gravity, and Bulk Density of Burned Refractory Brick and Shapes by Boiling Water, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2015.

ASTM E1252-98 (2013) e1, Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra for Qualitative Analysis, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013.

ASTM- F451-95 (2008), Standard Specification for Acrylic Bone Cement. West Conshohocken, PA, ASTM International, 2008.

AZI, M. L. *et al*. Cimento ósseo com gentamicina no tratamento da infecção óssea. Estudo da eluição in vitro. **Acta Ortopédica**, São Paulo, v.18, n.1, p. 31-34, 2010.

BANSE, X.; SIMS, T. J.; BAILEY, A. J**.** Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. **Journal of Bone and Mineral Research**, V. 17, n.9, p.1621-8, 2002.

BERMUDEZ, O. *et al*. Development of some calcium phosphate cements from combinations of α-TCP, MCPM and CaO. **Journal of Material Science**: Materials in Medicine, v.5, n.3, p.160-163, 1994.

BERUTO, D. T. *et al*. Use of alpha-tricalcium phosphate (TCP) as poweders and as na aqueous dispersion to modify processing, microstructure, and mechanical prperties of polymethylmethacrylate (PMMA) bone cements and to produce boné-substitute compunsds. **Journal of Biomedical Materials**, V. 49, n. 4, p. 498-505, 2000.

BERWIG, E. **Preparação e caracterização de filmes de poliuretano com potencial aplicação na liberação controlada de fármacos**. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BESSIÈRE, J.; KHAYAR, M.; ETAHIRI, A. Impedance studies of the adsorption of hydrophobic and hydrophylic species on mineral pulps. **Anal Chim Acta**, v.305, p.265-268, 1995.

BOHNER, M. *et al*. Gentamicin-Loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 86(5), p.565-572, 1997.

BOND, D. M. *et al*. Depot local anesthetic in polymethylmethacrylate bone cement: a preliminary study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.418, p. 242-245, 2004.

BOUKAMP, B. A. *et al*. Surface oxygen-exchange properties of bismuth oxide-based solid electrolytes and electrode materials. **Solid State Ionics**, v. 32–33, part 2, p. 918-923, 1989.

BOYAN, B. D. *et al*. Bone and cartilage tissue engineering. **Clin. Plast. Surg**. Philadelphia, v.26, n.4, 629-641, 1999.

BRANNON-PEPPAS, L. Polymers in controlled drug delivery. **J. Medical Plastic and Biomaterials,** v. 4, p. 34-45, 1997.

BRASIL. **Fortalecendo a governança para o crescimento. OCDE – Relatório sobre Reforma Regulatória**. Brasília: Casa Civil da Presidência da República, Brasília, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Página Inicial da Agência**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. Acesso em: 21/01/2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003**: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde, Brasília, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução ANVISA RDC. n. 59 de 27 de junho de 2000.** Regulamento Técnico que determina a todos fornecedores de produtos médicos, o cumprimento dos requisitos estabelecidos pelas Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos**.** Ministério da Saúde, Brasília, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução ANVISA RDC nº 56, de 06 de abril de 2001.** Dispõe sobre os requisitos para a comprovação da segurança e eficácia dos produtos para saúde. Ministério da Saúde, Brasília, 2001.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001.** Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário terapêutico nacional 2008: Rename 2006**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. ISBN 978-85-334-1473-0.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 01/02, de 28 de junho de 2002**. Dispõe sobre o exercício do poder de polícia pelos agentes da Agência de Vigilância Sanitária e dá outras providências. Diário Oficial da União. Seção. 1. p. 129 jun. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 81, de 05 de novembro de 2008**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Bens e Produtos Importados para fins de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União nº 219, de 11 de novembro de 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 1.161, de 31 de julho de 2012**. Diário Oficial da União. Seção. 1. p. 1. 01 ago. 2012;

BRUCE, P. G. **Solid State Electrochemistry**. Cambridge University Press, Cambridge: 1995.

CALHOUN, J. H. *et al*. The treatment of infected nonunions with gentamicin-polymethylmethacrylate antibiotic beads. **Clinical orthopaedics and related research**., n.295, p.23-27, 1993.

CANGIANI, L. H.; CANGIANI, L. M.; PEREIRA, A. M. S. A. Bupivacaína com Excesso Enantiomérico (S75-R25) a 0,5%, bupivacaína racêmica a 0,5% e lidocaína a 2% no bloqueio do nervo facial pela técnica de O'Brien: estudo comparativo. **Rev. Bras. Anestesiol**., v. 57, p. 136-146, 2007.

CARBINATTO, F. M. **Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara – São Paulo, 2010.

CARRODEGUAS, R. G*. et al*. Cimentos de alfa-Fosfato Tricálcico de Fraguado Doble. **Rev. CENIC Ciências Químicas**, Havana, v. 30, n. 3, p. 153-158, 1999.

CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Quím. Nova**, 4 (29), pp. 796-804, 2006.

CHAISRI, W. *et al*. Enhanced gentamicin loading and release of PLGA and PLHMGA microspheres by varying the formulation parameters. **Journal Colloids and Surfaces B**. **Biointerfaces**, v. 84, p.508-514, 2011.

CHANGEZ, M. *et al*. The effect of composition of poly (acrylic acid)–gelatin hydrogel on gentamicin sulphate release: in vitroǁ. **Biomaterials**, v. 24, p. 527-536, 2003.

CHIARINI, T.; VIEIRA, K. P. Universidades como produtoras de conhecimento para o desenvolvimento econômico: sistema superior de ensino e as políticas de CT&I. **Rev. Bras. Econ.**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 117-132, 2012.

CHOW, L. C. *et al*. Injectable Calcium Phosphate Cements: Effects of Cement Liquid on the Physical Properties of the Cement**, Medical Innovation**, v. 18, 1997.

CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharm.**, New Delhi, v.30, n.350, p.51-54, 1987.

CHRISTIAN, E. P.; BOSSE, M.J.; ROBB, G. Reconstruction of large diaphyseal defects, without free fibular transfer, in grade-IIIB tibial fractures. **Journal Bone Joint Surgeon American**, v.72, p.427-438, 1989.

CIRIMINNA, R. *et al*. From molecules to systems: sol-gel microencapsulation in silica-based materials. **Chemical Reviews**, v.111, n.2, p.765-789, fev. 2011. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr100161x>. Acesso em:

07/09/2015.

CLEMOW, A. J. T. *et al*. Interface Mechanics of Porous Titanium Implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 15, p.73 – 82, 1981.

COELHO, W. T *et al*. Effect on mechanical strength of Tricalcium Phosphate Cement by additions of Sodium Alginate. **Materials Science Forum**, v. 727-728, p. 1181-1186, 2012.

COLPO, J. C. **Proposta de Utilização do Vitrocerâmico Anortita como Sistema de Liberação de Fármacos**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2007.

COLPO, J. C.; NUNES, R. N.; ARAÚJO, W. N. Conhecimentos, atitudes e práticas sobre saúde do trabalhador na Coordenação de Portos, Aeroportos, Fronteiras e Recintos Alfandegados do Pará, Brasil, 2008. **Vigilância Sanitária em Debate**: Sociedade, Ciência & Tecnologia, 1(2), 2013.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural.** 2010. 241f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra – Portugal.

COOMBES, A.G.A.; CHANG, H.I.; PERRIE, Y. Delivery of the antibiotic gentamicin sulphate from precipitation cast matrices of polycaprolactone. **Journal of Controlled Release**, v.110, p. 414-421, 2006.

COOPER, D. J. *et al*. The gentamicin antibiotics. Part I. Structure and absolute stereochemistry of methyl garosaminide. **Journal of the Chemical Society C**, p. 960-963, 1971a.

COOPER, D. J. *et al*. The gentamicin antibiotics. 3. The gross structures of the gentamicin C componentes. **Journal of the Chemical Society C**, vol. 18, pp. 3126–3129, 1971b.

COSTA, P. J. C. Avaliação *in vitro* da lioequivalência de formulações farmacêuticas. Rev. Bras. Cien. Faramcêuticas, v. 38, n. 2, p. 141-53, 2002.

COVINO, B. G.; VASSALO, H. G. **Anestésicos locais**: mecanismos de ação e uso clinic. Rio de Janeiro: Colina, 1985.

DASH, A. K.; CUDWORTH, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.40, p.1-12, 1998.

De JONG, R. H. **Local Anesthetics**.1. ed. USA: Mosby-Year Book, 1994.

DEMARCHI, C. A. **Utilização de nanogel magnético como carregador de compostos maleimídicos com atividade antitumoral**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2014.

DESPAS, C. *et al*. High-frequency impedance measurement as a relevant tool for monitoring the apatitic cement setting reaction. **Acta Biomaterialia**, v.10, p.940-950, 2014.

DÓREA NETO, F. A. **Avaliação do cimento de alfa-fosfato tricálcico em artrodeses tarsocrurais experimentais em cães**. 2007. 83fls. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, 2007.

DRIESSENS, F. C. M. *et al*. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine,** v.4, p.503-508, 1993.

DRIESSENS, F. C. M. Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. **J Mater Sci Mater Med**. 5, p. 164–170, 1994.

DRIESSENS, F. C. M. *et al*. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. **Anal.Quim. Int. Ed.,** v. 93, n. 1, p.38-43, 1997.

DRUGBANK: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M.Nucleic Acids Res. 2008 Jan;36 (Database issue): D901-6. PubMed ID: 18048412. Disponivel em: < https://www.drugbank.ca/>. Acesso em 26. Jun. 2014.

EDGCOMBE, H.; HOCKING, G. Farmacologia dos anestésicos locais. In: BRINOSA, M.E.D.; NERONE, G. **Tutorial de anestesia da semana.** Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Oxford, UK, 2013.

ESCOBAR, C. F. **Obtenção e caracterização de cimento fosfato de cálcio e modelagem de implantes faciais.** 2010. 41 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ESPANOL, M. *et al*. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2752–2762, 2009.

EVANGELISTA, R. C. Tecnologia Farmacêutica para produção de medicamentos de liberação controlada. **Encontro Técnico Científico para as Indústrias Farmacêuticas e Cosméticas.** São Paulo: Racine Qualificação e Acessória, 1998. p. 01-80.

FERNANDES, B. L. *et al*. Biocompatible glassceramic applied in drug release system. **Rev. Bras. Eng. Bioméd**, Volume 24, n. 1, 2008.

FERNANDES, J. M. *et al.* Properties of calcium phosfate cement with addition of dispersant and hydrogel. **Materials Science Forum**, v. 727-728, p. 1170-1174, 2012.

FERNANDES, J. M. ***Síntese e caracterização de cimento de α-fosfato tricálcico reforçado com hidrogel de alginato de sódio e pva para aplicação médicoodontológica.*** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

FERNÁNDEZ, E. *et al*. High-strength Apatitic Cement by Modification with Superplasticizers. **Biomaterials**. Elsevier Science Direct, v. 26, p. 8, 2005a.

FERNÁNDEZ, E. *et a*l. Modulation of porosity in apatitic cements by the use of α-tricalcium phosphate calcium sulphate dehydrate mixtures. **Biomaterials**, v.26, p.3395-3404, 2005b.

FERNÁNDEZ, J. A. *et al*. Estudio cinético de liberación in vitro en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO3. **Rev. Iberoamericana de Polímeros**, v. 10, n.2, p. 119-130, 2009.

FERNÁNDEZ, J. A. GONZÁLEZ, R. S.; FUENTES, G. E. Estudio in vitro de liberación de fármacos desde un biomaterial compuesto. **Ciências Químicas**, v. 41 p. 1-8, 2010.

FERRAZ, H. G.; CONSIGLIERI, V. O.; STORPIRTIS, S. Avaliação da cinética de dissolução de ampililina em comprimidos comercializados no Brasil. **Ver. Farm. Bioquim**. Univ. S. Paulo, v.34, n.2, p. 93-99, 1998.

FISCHBACH, F. T. **Manual de Enfermagem exames laboratoriais e diagnósticos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

FLORENCE, A. T.; ATWOOD, D. **Physicochemical Principles of Pharmacy**. 3 ed. Great Britain: Creative Print & Design, 1998.

FOLKMAN, J. How the field of controlled-release technology began, and its central role in the development of angiogenesis research. **Biomaterials,** v.1, n.11, p.61-65, 1990.

FONSECA, E. P. **Construção da consciência sanitaria**. Webartigos, 2011. Disponível em: <http://www.webartigos.com/artigos/costrucao-da-consciencia-sanitaria/64466/#ixzz4TCNf2YjY>. Acesso em 14/09/2016.

FORWOOD, M. R. Mechanical effects on the skeleton: are there clinical implications? **Osteoporos**. Int. v. 12, n. 1, p. 77-83, 2001.

FRANÇA, V. P. *et al.* Estudo comparativo experimental de compósito bioativo de matriz polimérica para aplicação em cirurgia plástica ocular na substituição tecidual. **Arq. Bras. Oftalmol**, v.68, n.4, p.425-431, 2005.

FUNG, L. K., SALTZMAN, W. M. Polymeric implants for cancer chemotherapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 26, p. 209-230, 1997.

GAUTIER, H. *et al*. In vitro characterisation of calcium phosphate biomaterials loaded

with lidocaine hydrochloride and morphine hydrochloride. **J Mater Sci Mater Med,** v. 21(12), p. 3141-50, 2010.

GERMAN, R.M. Particle packing characteristics: by Randall M. German, published by **Metal Powder Industries Federation**, Princeton, NJ, U.S.A., 1999; 443 pp., ISBN 0-918404-83-5.

GINEBRA, M. P. *et al*. The effects of temperature on the behaviour of an apatitic calcium phosphate cement. **J Mater Sci mater Med**, v. 6, p. 857-860, 1995.

GINEBRA, M. P. *et al*. Setting reaction and hardening of na apatitic calcium phosphate cement**. J of Dental Res**, v.76(4), p. 905-912, 1997.

GINEBRA, M. P. TRAYKOVA, T.; PLANELL, J. A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. **J of Contr Release**, v. 113, n. 2, p. 102-110, 2006.

GINEBRA, M. P.; DRIESSENS, F. C; PLANELL, J. A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. **Biomaterials**, v. 25, Issue 17, p. 3453-3462, 2004.

GIORDANO, V. *et al*. Ensaio mecânico da resistência ao impacto do cimento ósseo puro e associado a duas drogas anestésicas locais., Revista Brasileira de Ortopedia, v.42, n.7, p. 225-230, 2007.

GOODMAN, A. G.; GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9ª ed., McGraw-Hill: Rio de Janeiro, 1996.

GRISTINA, A. G.; COSTERTON, J. W. Bacterial adherence to biomaterials and tissue: the significance of its role in clinical sepsis. **J Bone Joint Surg Am.,** v.67, p.264-273,1985.

GRUNINGER, S. E. *et al*. Evaluation of the biocompatibility of a new calcium-phosphate setting cement. In: **J of Dental Res**. DUKE ST, ALEXANDRIA, p. 200-200, 1984..

GUIMARÃES, S.; MOURA, D.; DA SILVA, P. S. **Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: manual de farmacologia e farmacoterapia**. 2006.

HENCH, L. L. Bioceramics. **J Amer Ceramic Soc**, v. 81, p. 1705-1733, 1998a.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v.19, p.1419-1423, 1998b.

HENCH, L. L. The story os Bioglass. **J Mater Sci mater Med**, v.17, p.967-978, 2006.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drug dispersed in solid matrices. **J Pharm Sci**., v. 52, n.12, p.1145-1149, 1963.

HING, K. A.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Characterization of porous hydroxyapatite. **J Mater Sci mater Med,** v. 10, n. 3, p.135-45, 1999.

HOEPFNER, T. P.; CASE, E. D. The porosity dependence of the dielectric constant for sintered hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res**, v.60, p. 643-50, 2002.

HOMSY, C. A. *et al*. Porous Implant Systems for Prosthesis Stabilization. **Clin Orth and Related Res**, nº 89, p. 220–235, 1972.

HORLOCKER, T. T.; WEDEL, D. J. Local Anesthetic Toxicity – Does Product Labeling Reflect Actual Risk? **Reg Anesth Pain Med**, v. 27, p. 562-567, 2002.

HUISKES, R. If bone is the answer, thenwhat is the question? **The Journal of Anatomye**, v. 1997, n. 2, p. 145-56, 2000.

IRBE, Z. *et al*. Controlled release of local anesthetic from calcium phosphate bone cements**. Mater Sci and Eng C**, v. 32, p. 1690–1694, 2012.

JOOSTEN, U. *et al*. Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as anew carrier material for gentamicin in the treatment of chronicosteomyelitis: studies in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 25, p. 4287-95, 2004.

JONES, F. H. Teeth and Bones: applications of surface science to dental materials na related biomaterials. **Surface Sci Reports**, 42, p. 75-205, 2001.

JOSUE, A. *et al*. Controlled release of eosin impregnated in microspheres of chitosan/poly(acrylic acid) copolymer. **Polímeros,** v.10, p.116-121, 2000.

KAMEGAI, A. *et al*. Bone formationunder the influence of boné morphogenetic protein/self-setting apatite cement composite as delivery system. **Biomed Mater Eng**, v. 4, p. 291-307, 1994.

KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, p. 5474–5491, 2005.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KIMURA, H.; OGURA, Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. **Ophthalmologica,** v. 215, p. 143-55, 2001.

KLAWITTER, J. J.; HULBERT, S. F. Application of porous ceramics for theattachment of load bearing internal orthopedic applications. **J Biomed Mater Res**, v. 5, p. 161–229, 1971.

KLEIN, C. P.; Driessen, A.A.; De GROOT, K. Al relationship between the degradation behavior of calcium phosphate ceramics and their physical-chemical characteristics and ultrastructural geometry. **Biomaterial**, v. 5 (3), p. 157-160, 1984.

KNUDSEN, K. *et al*. Efeitos nervoso central e cardiovascular das IV infusões de

ropivacaína, bupivacaína e placebo em voluntários. **J britânico da anestesia**, v. 78, n. 5, p. 507-514, 1997.

KOKER, S. *et al*. Polymeric multilayer capsules delivering biotherapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 748-761, 2011.

KONG, G. *et al*. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. **Cancer Res**., v. 60, p. 695-697, 2000.

KORSMEYER, R. W; PEPPAS, N. A. Mechanism of release from porous hydrophilic polymers. **Int J Pharm**, v. 15, n.1, p. 25-35, 1983.

LAZZARINI, L.; MADER, J. T.; CALHOUN, J. H. Osteomyelitis in long bones. **J Bone Joint Surg Am**, v. 86, n. 10, p. 2305-2318, 2004.

LEE, S. H.; SHIN, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Adv drug delivery rev**, v. 59, n. 4, p. 339-359, 2007.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. **Monography in Oral Science**, Switzerland, Karger, 1991

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, v. 395, p. 81–98. 2002.

LEROUX, L. *et al*. Effects of Various Adjuvants (Lactic Acid, Glycerol, and Chitosan) on the Injectability of a Calcium Phosphate Cement. **Bone Else Sci-Direct**, 1999.

LIMA, A. L. M. Osteomielites. Sociedade Brasileira de Infectologia. **Entrevista.** 16/setembro/2013. Disponível em: <http://www.infectologia.org.br/noticias?id=21> Acesso em 10/outrubro/2013.

LINDNER, W.; LIPPOLD, B. Drug release from hydrocolloid embedding with high or low susceptibility to hydrodynamic stress. **Pharm Res**, v. 12, p. 1781–5, 1995.

LIU, C. *et al*. Effects of the granularity of raw materials on the hydration and hardening process of calcium phosphate cement. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4103-4113, 2003.

LYRA, M. A. M. *et al.* Study of benznidazole-cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity. **J of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry** (Online), v. 73, p. 397-404, 2012.

MACHADO, J. L. M. **Desenvolvimento de cimento ósseo de fosfato de cálcio como suporte para o crescimento de tecidos**. 2007.166 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção

oral de fármacos em formas farmacêutica de liberação modificada. **Rev Bras Cien Farm**, v. 38, n. 4, p. 375-99, 2002.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 127 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêutico) – Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.

MARMUR, E.; GREEN, L.; BUSSO, M. Controlled, Randomized Study of Pain 42. Levels in Subjects Treated with Calcium Hydroxylapatite premixed with lidocaine for correction of nasolabial folds. **Dermatolocis Surgery**, v. 36, p. 309-315, 2010.

MARQUES NETO, F. A. **Agências Reguladoras independentes**: fundamentos e se regime jurídico. Belo Horizonte: Fórum, 2005.

MARTIN, A., SWARBRICK, J. E., CAMMARATA, A. **Physical Pharmacy**. 4 ed. Pensilvania: Lippincott Williams & Willians, 1993.

MELO, N. F. S. *et al*. Development of liposomes loaded with charged articaine using experimental design**. In: Fraceto, LF; de Araujo DR. (Org.).** Microspheres: technologies, applications and role in drug delivery. 1ed. New York: Nova Science Publishers Inc, v. 1, p. 245-255, 2014.

MINDESS, S. Relationships between strength and microstructure for cement-based materials: An overview. In: Very high strength concrete-based-materials, **Mat Res Soc Symp Proc**, v.42, p.53-68, 1985.

MIÑO-FARINA, N. *et al*. A análise quantitativa da reabsorção e osteocondução de um cimento ósseo de fosfato de cálcio macroporoso para a reparação de um defeito de tamanho crítico no côndilo femoral. **O Veter J,** v. 179, n. 2, p. 264-272, 2009.

MIRTCHI, A. A.; LEMAITRE, J.; TERAO, N. Fosfato de cálcio Cimentos: Estudo do sistema de fosfato-monocalcium β-tricálcio. **Biomaterials**, v 10, n. 7, p. 475-480, 1989.

MOLINS, M. P. **Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico-α para aplicaciones quirúrgicas**.1996, 48 f. Tese (Doutorado) - Universitat Politècnica de Catalunya, Catalúnia, 1996.

MONMA, H. The hydration of alpha-tricalcium phosphate. **Yogo-Kyokai-shi**, v. 84, p. 209-213, 1976.

MOORE, D. S.; NOTZ, W. I.; FLIGNER, M. A. **A estatística básica e sua prática**. 6 ed. Rio de janeiro: LTC, 2016.

MORAES, P.C *et al*. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cir Bras** [serial online] 2004 Jul-Ag;19(4). Disponível em URL: http://www.scielo.br/acb. Acesso em 13/02/2013.

MORAIS, E.C. **Sílicas sintetizadas por impressão molecular para absorção/ pré-concentração de fármacos**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MOREJÓN-ALONSO, L.; TRAJANO, C. W.; DOS SANTOS, L. A. Dual setting α-tricalcium phosphate composite cement obtained by 3d printing. **Rev CENIC Cien Quím**, v. 46, p. 62-65, 2015.

NAGEM FILHO, H. *et.al*. Engenharia tecidual dos biomateriais. **Innov Impl J** - **Biom and Esth**, v. 1, p. 54-62, 2006.

NANDI, S. K. *et. al.* Efficacy ofnano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustiontechnique in healing bone defects of goat. **J Vet Sci**, v. 9, p. 183–91, 2008.

NANDI, S. K. *et. al*. Localantibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis: areview. **Mater Sci Eng C**, v. 29, p. 2478–85, 2009.

NELSON, C. L. The current status of material used for depot delivery of drugs. **Clin Orthop Relat Res.**, n.427, p.72-78, 2004.

NELSON, C. L. *et. al*. A comparison of gentamicin-inpregnated polymethylmethacrylatebead implanation to conventiona parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty. **Clin Orthop Relat Res**, n. 295, p. 96-101, 1993.

ODEN, E. M.; WAGMAN, G. H.; WEINSTEIN, M. J. Gentamycin. In: KAVANAGH, F. (Ed.). **Analytical Microbiology**. New York: Academic Press, v.2, p. 271-284, 1972.

OGAWA, C. A; PLEPIS, A. M. G. Liberação *in vitro* de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita: colágeno. **Polím: Ciên e Tecn**, v. 12, n. 2, p. 115-122, 2002.

OLIVEIRA, S. M. *et a*l. Engineering endochondral bone: in vivo studies. **Tiss Engin Part A**, v. 15, n. 3, p. 635-643, 2009.

OSTERMANN, P. A. W.; HENRY, S. L.; SELIGSON, D. The role of local antibiotic therapy in the management of compound fractures. **Clin Orthop Relat Res**, v. 295, p. 102-111, 1993.

OTSUKA, M. *et al*. A novel skeletal drug delivery system using a self-setting calcium orthophosphate cement. 2. Physicochemical properties and drug release rate of the cement-containing indomethacin. **J Pharm Sci**, v. 83, p. 611-615, 1994a.

OTSUKA, M. *et al*. A novel skeletal drug delivery system using a self-setting calcium orthophosphate cement. 5. Drug release behavior from a heterogeneous drug-loaded cement containing na anticâncer drug. **J Pharm Sci**, v. 83, p. 1565-1568, 1994b.

OTSUKA, M. *et al*. A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium

phosphate cement. 9: Effect of the mixing solution volume on anticancer drug release from homogeneous drug-loaded cement. **J Pharm Sci**, v. 84(6), p. 733-736, 1994c.

PAAVOLA, A. *et al*. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharm Res**, v. 12, p. 1997-2002, 1995.

PADILLA, S.; DEL REAL, R. P.; VALLET-REGÍ, M. Influencia del contenido de OHAP y de gentamicina en la liberación del antibiótico a partir de composites de OHAP/PEMMA. **Biomecánica**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2001.

PARK, J. B. **Biomaterials Science and Engineering**. New York: Plenum Press, 1984.

PARK, J. B. **Biomaterials: an introduction**. New York: Plenum Press, 1979.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. Int J Pharm, v. 57, p. 169–72, 1989.

PEPPAS, N. A; SIEPMANN, J. Modeling of drug release from delivery systems based onhydroxypropyl methylcellulose. **Adv Drug Deliv Rev**, v.48, 2001.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. **Polím: ciên e tecn,** v.9, n.4, p. 104-109, 1999.

Rang H. *et al*. **Rang and Dale's Pharmacology**. 8 ed. Elsevier: Edinburgh, 2015.

RATNER, B. D. *et al*. **Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996.

RIGO, E. C. S. **Efeito das condições de precipitação sobre as características físico-químicas dos compostos de hidroxiapatita**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 1995.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A. Simple equation for description ofsolute release. II. Fickian and anomalous release from swellabledevice. **J Contr Release**, v. 5, p. 37–42, 1987.

ROOSA, S. M. M. *et al*. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. **J of Biom Mater Res Part A**, v. 92, n. 1, p. 359-368, 2010.

SANTOS, L. A. *et. al*. Influence of Polymeric Additives on the Mechanical Properties of a-Tricalcium Phosphate Cement. **Bone,** New York: Elsevier, v. 25, n.2, p. 99S-102S, 1999.

SANTOS, L. A; BOSCHI, A. O; ARRUDA, A. C. F. **Cimentos de Fosfatos de Cálcio de Dupla Pega. Pedido de Patente 0000760-9. INPI- Instituto Nacional da Propriedade Industrial**. Solicitante: Universidade Estadual de Campinas. São Paulo: Univ. Estadual de Campinas, 22 de fevereiro de 2000.

SANTOS, L. A. *et. al*. Melhoria microestrutural de cimento de fosfato de cálcio de dupla pega. **Anais do 45º Congresso Brasileiro de Cerâmica**, Florianópolis, 2001.

SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio para Uso na Área Médico-Odontológica**. 2002. 247fls. Tese (Doutorado em Materiais e Processo de Fabricação) - Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SANTOS, L. A. *et.al*. Cimento ósseo de fosfato de cálcio de dupla pega: avaliação *in vivo*. **Projeções**, v. 23, p. 47-53, 2005.

SEPULVEDA, P.; JONES, J. R.; HENCH, L. L. Bioactive Sol-gel Foams for Tissue Repair. **J Biomed Mater Res**, v.59 (2), p. 340-348, 2002.

SHIMA, T. *et al*. Anterior Cervical Disectomy and Interbody Fusion.An Experimental Study Using Syntetic Tricalcium Phosphate. **Journal of Neurosurgery**, v 51, n. 4, p. 533-538, 1979.

SIDDALL, P. J.; COUSINS, M. J. Pain mechanisms and management: an update. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.22, p. 679-688, 1995.

SIEGEL, R. A.; RATHBONE, M. J. Overview of controlled release mechanisms. In: **Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery**. Springer US, p. 19-43, 2012.

SILVA JUNIOR, P. E.; ORÉFICE, R. L. Compósitos Bioativos Obtidos a Partir da Inserção de Vidro Bioativo em Matriz de Poli(Metacrilato de Metila). **Polím**: **ciên e tecn**, v.11, n.3, p.109-115, 2001.

SILVA, G. H. T. Regulação Sanitária no Brasil: singularidades, avanços e desafios. In: PROENÇA, J.D.; COSTA, P.V.; MONTAGNER, P. (Org.). **Desafios da regulação no Brasil**. Brasília: ENAP, 2009.

SILVA, R. L. **Sistema de Liberação Controlada de Quitosana Contendo Antigeno Capsular Vi de Salmonella Typhi**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém – Pará.

SIMÓ, C.; CIFUENTS, A.; GALLARDO, A. Drug Delivery Systems: Polymers and Drugs Monitored by Capillary Electromigration Methods. **J of Chromato B**, v. 797, p. 37-49, 2003.

SOUNDRAPANDIAN, C.; Datta, S.; Sa, B. Drug-eluting implants for osteomyelitis. **Crit Rev the Drug Carrier Syst**, v. 24, p. 493–545, 2007.

SOUSA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Porto: Editora Universidade Fernando Pessoa, 2010.

STENGEL, D. *et al*. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for

bone and joint infections. **Lancet**, v.1, p. 175-188, 2001.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica: fundamentos da biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos**. São Paulo, 1999.

TANG, L.; EATON, J. W. Inflammatory responses to biomaterials**. Amer J of Clin Path**, v.103, n. 4, p. 466-471, 1995.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e quimioterápicos Antiinfecciosos**. São Paulo: Atheneu, 1996.

THÜRMER, M. B.; DIEHL, C. E.; SANTOS, L. A. Desenvolvimento de cimento ósseo compósito baseado em alfa-fosfato tricálcico e hidrogéis. In: **XXIII Congresso Brasileiro em Engenharia Biomédica**. Anais**.** Porto de Galinhas, PE, 2012a.

THÜRMER, M. B. *et al*. Synthesis of alpha-tricalcium phosphate by wet reaction and evaluation of mechanical properties. **Materials Science Forum**, v. 727-728, p. 1164-1169, 2012b.

THÜRMER, M. B. **Alfa-fosfato tricálcico obtido por reação via úmida para aplicação em cimentos ósseos e cimentos compósitos**. Tese (Doutorado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

TIRRELL, M.; KOKKOLI, E.; BIESALSKI, M. The role of surface science in bioengIneered materials. **Surface science**, v. 500, p. 61-83, 2002.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 2, p. 145-60, 2005.

TRABULSI, L. R.; SOARES, L. A. Antibióticos Aminoglicosídeos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998.

TSURUGA, E. *et al*. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. **J of biochemistry**, v. 121, n. 2, p. 317-324, 1997.

TUNG, I. C. *In vitro* drug release of antibiotic-loaded porous hy-droxyapatite cement. **Artif Cells Blood Substit Immobil Bio-technol**, v. 23, p. 81–81, 1995.

VALLET-REGI, M. Ordered mesoporous materials in the context of drug delivery systems and bone tissue engineering. **Chem-A Europ J**, v. 12, n. 23, p. 5934-43, 2006.

VALLET-REGI, M. BALAS, F.; ARCOS, D. Mesoporous Materials for Drug Delivery. **Ang Chem Intern Ed**, v. 46, n. 40, p. 7548-7558, 2007.

VALLET-REGI, M. *et al*. Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability. **Prog in SolSt Chem**, v. 36, n. 3, p. 163-191,

2008.

VAN KEMENADE, M. J. J. M.; DE BRUYN, P. L. A. kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. **J Colloid Interface Sci**, v. 118(2), p. 564-85, 1987.

VAN LENTHE, G. H. *et. al*. Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold–bone interaction in vivo. **Biomaterials**, v. 28 (15), p. 2479-2490, 2007.

VASCONCELLOS, L. A. **Obtenção de compósitos de fosfato de cálcio com fibras de PLGA e alginato de sódio** Tese (Doutorado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

VERRON, E. *et al*. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. **Drug Discov Today**, v. 15, p. 547–552, 2010a.

VERRON, E. *et al*. Analgesic properties of calcium phosphate apatite loaded with bupivacaine on postoperative pain. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 94(1), p. 89–96, 2010b.

VIEIRA, R. S. *et al*. Evaluation of α-Tricalcium Phosphate Cement Obtained at Different Temperatures. **Mater Sci Forum**, v. 727-728, p. 1187-1192, 2012.

VOLKMER, T. M. *et al*. Novel method for the obtainment of nanostructured calcium phosphate cements: Synthesis, mechanical strength and cytotoxicity. **Powder Technology** (Print), v. 235, p. 599-605, 2013.

WANG, F. J. *et al*. Cellulose acetate membranes for transdermal delivery of scopolamine base. Elsevier, **Mater Sci and Engin**, n. 20, p. 93-100, 2002.

WANG, C. *et al*. An absorbable local anesthetic matrix provides several days of functional sciatic nerve blockade. **Anesth Analg**, v. 108(3), p. 1027-33, 2009.

WEINSTEIN, M. J. *et al*. Gentamicin, 1 a new antibiotic complex from micromonospora. **J of medic chem**, v. 6, n. 4, p. 463-464, 1963.

WHANG, K. *et al*. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. **Tissue Engineering**, v. 5, p. 35-51, 1999.

WHITESIDE, J. B.; WILDSMITH, J. A. W. Developments in local anesthe tics drugs. **Br J Anaesth**, v. 87, p. 27-35, 2001.

WILLIAM, D. F. **Definitions in biomaterials**. New York: Elsevier, 1987.

WOLFF, J. **Das Gesetz der Transformation der Knochen**. Berlin: A. Hirchwild, 1892.

YU, D. *et al*. Self-setting hydroxyapatite cement: A novel skeletal drug-delivery

system for antibiotics. **J of Pharm Sci**, v. 81, p. 529-531, 1992.

ZALAVRAS, C.; PATZAKIS, M. J.; HOLTOM, P. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. **Clin Orthop Relat Res**, n. 427, p. 86-93, 2004.

ANEXO I - Tabela com os resultados das análises das medidas de tendência central para os diferentes subconjuntos e grupos amostrados para a Densidade aparente, Porosidade total, Porosidade aparente e Absorção de líquido.

	Amostras	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Erro Padrão	Desvio Padrão	Variância	Coeficiente de Variação	Assimetria
Densidade aparente (g/cm^3)	Subconjunto α-TCP	1,52	1,65	1,65	1,72	0,01	0,05	0	0,03	-0,67
	Subconjunto α-TCP DP	1,91	1,96	1,95	2,03	0,01	0,04	0	0,02	0,69
	α-TCP Controle	1,57	1,62	1,63	1,68	0,02	0,04	0	0,03	0,1
	α-TCP Genta	1,69	1,71	1,71	1,72	0,01	0,01	0	0,01	-0,24
	α-TCP Lido	1,52	1,61	1,65	1,68	0,03	0,07	0,01	0,05	-0,33
	α-TCP Bupi	1,59	1,64	1,65	1,68	0,02	0,03	0	0,02	-0,53
	α-TCP Levo	1,61	1,66	1,65	1,72	0,02	0,04	0	0,02	0,35
	α-TCP DP Controle	1,91	1,93	1,94	1,94	0,01	0,01	0	0,01	-0,42
	α-TCP DP Genta	1,99	2,02	2,03	2,03	0,01	0,02	0	0,01	-0,6
	α-TCP DP Lido	1,94	1,96	1,95	1,98	0,01	0,02	0	0,01	0,28
	α-TCP DP Bupi	1,92	1,94	1,94	1,96	0,01	0,02	0	0,01	0,08
	α-TCP DP Levo	1,94	1,96	1,95	2	0,01	0,02	0	0,01	0,36
Porosidade Total (%)	Subconjunto α-TCP	37,35	38,4	38,62	40,7	0,16	0,81	0,66	0,02	0,53
	Subconjunto α-TCP DP	35,53	38,17	38,5	39,85	0,26	1,31	1,71	0,03	-0,83
	α-TCP Controle	38,71	39,43	39,34	40,07	0,24	0,54	0,29	0,01	-0,09
	α-TCP Genta	37,35	37,97	38,28	38,44	0,23	0,51	0,26	0,01	-0,28
	α-TCP Lido	38,24	38,41	38,42	38,62	0,07	0,15	0,02	0,00	0,24
	α-TCP Bupi	38,76	39,52	39,05	40,69	0,39	0,88	0,78	0,02	0,33
	α-TCP Levo	37,84	38,56	38,56	39,21	0,25	0,56	0,31	0,01	-0,08
	α-TCP DP Controle	38,3	38,99	39,09	39,5	0,21	0,46	0,21	0,01	-0,34
	α-TCP DP Genta	35,53	35,98	35,68	36,86	0,25	0,56	0,31	0,02	0,6
	α-TCP DP Lido	38,44	38,85	38,63	39,54	0,21	0,47	0,23	0,01	0,42
	α-TCP DP Bupi	38,76	39,19	39,12	39,85	0,19	0,41	0,17	0,01	0,54
	α-TCP DP Levo	36,77	37,82	37,81	38,47	0,32	0,71	0,5	0,02	-0,36

	Amostras	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Erro Padrão	Desvio Padrão	Variância	Coeficiente de Variação	Assimetria
Porosidade aparente (%)	Subconjunto α-TCP	26,57	31,06	30,48	37,69	0,66	3,3	10,87	0,11	0,62
	Subconjunto α-TCP DP	15,85	24,60	26,39	28,73	0,87	4,36	18,99	0,18	-1,17
	α-TCP Controle	35,52	36,63	36,5	37,69	0,43	0,97	0,95	0,03	0,04
	α-TCP Genta	26,57	26,93	26,97	27,41	0,16	0,36	0,13	0,01	0,11
	α-TCP Lido	30,48	31,41	31,25	32,34	0,38	0,86	0,73	0,03	0,09
	α-TCP Bupi	29,74	30,62	30,48	31,85	0,37	0,84	0,7	0,03	0,35
	α-TCP Levo	29,53	29,71	29,76	29,92	0,08	0,18	0,03	0,01	-0,04
	α-TCP DP Controle	24,25	25,13	24,72	26,39	0,39	0,87	0,76	0,03	0,39
	α-TCP DP Genta	15,85	16,39	16,54	16,98	0,20	0,45	0,2	0,03	0,02
	α-TCP DP Lido	27,14	27,86	27,82	28,73	0,33	0,73	0,53	0,03	0,08
	α-TCP DP Bupi	26,69	27,38	27,34	27,92	0,21	0,48	0,23	0,02	-0,25

	α-TCP DP Levo	25,27	26,25	25,63	27,68	0,49	1,11	1,22	0,04	0,31
Absorção de líquido (%)	Subconjunto α-TCP	11,2	13,26	12,97	16,28	0,29	1,47	2,17	0,11	0,66
	Subconjunto α-TCP DP	6,48	10,31	11,27	12,13	0,39	1,93	3,73	0,19	-1,2
	α-TCP Controle	15,06	15,72	15,64	16,28	0,25	0,55	0,31	0,04	0,01
	α-TCP Genta	11,2	11,47	11,45	11,69	0,09	0,19	0,04	0,02	-0,21
	α-TCP Lido	13	13,5	13,35	14,13	0,2	0,44	0,19	0,03	0,3
	α-TCP Bupi	12,66	13,08	12,97	13,63	0,16	0,37	0,13	0,03	0,34
	α-TCP Levo	12,44	12,53	12,52	12,67	0,04	0,09	0,01	0,01	0,29
	α-TCP DP Controle	10,24	10,68	10,44	11,34	0,2	0,46	0,21	0,04	0,41
	α-TCP DP Genta	6,48	6,65	6,67	6,86	0,07	0,16	0,02	0,02	0,09
	α-TCP DP Lido	11,27	11,67	11,56	12,13	0,16	0,37	0,14	0,03	0,16
	α-TCP DP Bupi	11,29	11,58	11,64	11,67	0,07	0,16	0,03	0,01	-1,06
	α-TCP DP Levo	10,47	10,97	10,82	11,52	0,2	0,45	0,21	0,04	0,16

ANEXO II - Tabela com as diferenças analíticas entre as médias de acordo com as variáveis analisadas para a densidade aparente, porosidade total, porosidade aparente e absorção de líquido.

	Subconjuntos	n	Média	Desvio Padrão	IC (95%)	T de student *p*-valor
Densidade aparente (g/cm³)	α-TCP	25	1,64	0,05	-0,35 -0,3	<0,01
	α-TCP DP	25	1,96	0,04		
	Grupos	**n**	**Média**	**Desvio Padrão**	**IC (95%)**	**Tukey *p*-valor**
	α-TCP Controle	5	1,62	0,04	0,232 0,386	<0,01
	α-TCP DP Controle	5	1,93	0,01		
	α-TCP DP Controle	5	1,93	0,01	0,014 0,167	0,01
	α-TCP DP Genta	5	2,02	0,02		
	α-TCP Genta	5	1,71	0,01	-0,439 -0,285	<0,01
	α-TCP DP Genta	5	2,02	0,02		
	α-TCP Controle	5	1,62	0,04	-0,084 0,07	**>0,05**
	α-TCP Lido	5	1,61	0,07		
	α-TCP Lido	5	1,61	0,07	-0,421 -0,267	<0,01
	α-TCP DP Lido	5	1,96	0,02		
	α-TCP Bupi	5	1,64	0,03	-0,375 -0,221	<0,01
	α-TCP DP Bupi	5	1,94	0,02		
	α-TCP Levo	5	1,66	0,03	-0,381 -0,227	<0,01
	α-TCP DP Levo	5	1,96	0,02		
Subconjuntos		**n**	**Média**	**Desvio Padrão**	**IC (95%)**	**T de student *p*-valor**
Porosidade total (%)	α-TCP		38,78	0,81	-0,01 1,23	**0,05**
	α-TCP DP		38,17	1,31		
	Grupos	**n**	**Média**	**Desvio Padrão**	**IC (95%)**	**Tukey *p*-valor**
	α-TCP Controle		39,43	0,54	-2,638 -0,287	<0,01
	α-TCP Genta		37,97	0,51		
	α-TCP Controle		39,43	0,54	-1,26 1,09	**>0,05**
	α-TCP Bupi		39,52	0,88		
	α-TCP DP Controle		38,99	0,46	-1,71 0,64	**>0,05**
	α-TCP DP Bupi		39,19	0,41		
	α-TCP DP Controle		38,99	0,46	-4,178 -1,827	<0,01
	α-TCP DP Genta		35,98	0,56		
	α-TCP Genta		37,97	0,51	0,813 3,164	<0,01
	α-TCP DP Genta		35,98	0,56		
Porosidade aparente (%)	**Subconjuntos**	**n**	**Média**	**Desvio Padrão**	**IC (95%)**	**T de student *p*-valor**
	α-TCP	25	31,06	3,3	4,26 8,65	<0,01
	α-TCP DP	25	24,6	4,36		
	Grupos	**n**	**Média**	**Desvio Padrão**	**IC (95%)**	**Tukey *p*-valor**
	α-TCP Controle	5	36,63	0,97	9,93 13,07	<0,01
	α-TCP DP Controle	5	25,13	0,87		
	α-TCP Controle	5	36,63	0,97	8,13 11,26	<0,01
	α-TCP Genta	5	26,93	0,36		
	α-TCP DP Controle	5	25,13	0,87	7,17 10,31	<0,01
	α-TCP DP Genta	5	16,39	0,45		
	α-TCP Genta	5	26,93	0,36	8,97 12,11	<0,01
	α-TCP DP Genta	5	16,39	0,45		

	α-TCP Controle	5	36,63	0,97	3,65 6,79	<0,01
	α-TCP Lido	5	31,41	0,86		
	α-TCP DP Controle	5	25,13	0,87	-4,3 -1,17	<0,01
	α-TCP DP Lido	5	27,86	0,73		
	α-TCP Lido	5	31,41	0,86	1,97 5,11	<0,01
	α-TCP DP Lido	5	27,86	0,73		
	α-TCP DP Controle	5	25,13	0,87	- 3,82 -0,69	<0,01
	α-TCP DP Bupi	5	27,38	0,48		
	α-TCP Controle	5	25,13	0,87	-8,49 -5,35	<0,01
	α-TCP Levo	5	29,71	0,18		
	α-TCP Levo	5	29,71	0,18	-5,02 -1,89	<0,01
	α-TCP DP Levo	5	26,25	1,11		
Absorção de líquido (%)	**Subconjuntos**	**n**	**Média**	**Desvio Padrão**	**IC (95%)**	**T de student *p*-valor**
	α-TCP	25	13,26	1,47	1,97 3,93	<0,01
	α-TCP DP	25	10,31	1,93		
	Grupos	**n**	**Média**	**Desvio Padrão**	**IC (95%)**	**Tukey *p*-valor**
	α-TCP Controle	5	15,72	0,55	4,28 5,79	<0,01
	α-TCP DP Controle	5	10,68	0,46		
	α-TCP Controle	5	15,72	0,55	3,49 5	<0,01
	α-TCP Genta	5	11,47	0,19		
	α-TCP DP Controle	5	10,68	0,46	3,27 4,78	<0,01
	α-TCP DP Genta	5	6,65	0,16		
	α-TCP Genta	5	11,47	0,19	4,06 5,57	<0,01
	α-TCP DP Genta	5	6,65	0,16		
	α-TCP Controle	5	15,72	0,55	1,46 2,98	<0,01
	α-TCP Lido	5	13,5	0,44		
	α-TCP DP Controle	5	10,68	0,46	-1,75 -0,24	<0,01
	α-TCP DP Lido	5	11,67	0,37		
	α-TCP Lido	5	13,5	0,44	1,07 2,58	<0,01
	α-TCP DP Lido	5	11,67	0,37		
	α-TCP Controle	5	15,72	0,55	1,88 3,39	<0,01
	α-TCP Bupi	5	13,08	0,44		
	α-TCP DP Controle	5	10,68	0,46	-1,66 -0,14	<0,01
	α-TCP DP Bupi	5	11,58	0,16		
	α-TCP Bupi	5	13,08	0,44	0,75 2,26	<0,01
	α-TCP DP Bupi	5	11,58	0,16		
	α-TCP Controle	5	15,72	0,55	2,43 3,94	<0,01
	α-TCP Levo	5	12,53	0,09		
	α-TCP DP Controle	5	10,68	0,46	1,05 0,47	**>0,05**
	α-TCP DP Levo	5	10,97	0,45		
	α-TCP Levo	5	12,53	0,09	0,81 2,32	<0,01
	α-TCP DP Levo	5	10,97	0,45		

ANEXO III - Resumo descritivo dos grupos de corpos de prova submetidos ao ensaio de resistência mecânica, teste de compressão axial (MPa).

Resistência à compressão axial

Grupos	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Erro Padrão	Desvio Padrão	Variância	Coeficiente de Variação	Assimetria	Curtose
Pré Controole	5,352	6,635	6,513	8,433	0,333	1,052	1,107	0,159	0,422	-1,409
Pré Genta	8,113	10,613	10,222	13,068	0,540	1,706	2,912	0,161	0,076	-1,691
Pré Lido	6,181	7,448	7,127	9,444	0,346	1,094	1,197	0,147	0,483	-1,247
Pré Bupi	6,632	7,719	7,759	8,758	0,192	0,608	0,369	0,079	-0,049	-0,936
Pré Levo	6,538	8,587	8,395	10,442	0,469	1,482	2,196	0,173	-0,085	-1,704
Pré DP Controole	29,056	33,362	32,920	38,780	0,896	2,832	8,021	0,085	0,316	-0,840
Pré DP Genta	46,859	48,202	48,001	50,913	0,424	1,339	1,794	0,028	0,747	-0,855
Pré DP Lido	11,403	12,719	12,282	15,907	0,453	1,433	2,055	0,113	0,968	-0,284
Pré DP Bupi	31,477	35,589	35,109	40,911	1,077	3,406	11,598	0,096	0,177	-1,753
Pré DP Levo	24,946	28,140	28,324	31,107	0,739	2,338	5,466	0,083	-0,104	-1,845
Pós Controole	13,204	29,835	30,147	46,922	5,808	12,988	168,684	0,435	0,024	-1,823
Pós Genta	18,813	21,535	21,277	25,109	1,232	2,756	7,595	0,128	0,158	-2,054
Pós Lido	14,800	20,743	18,412	28,971	2,723	6,090	37,083	0,294	0,299	-2,032
Pós Bupi	17,192	21,571	21,456	25,669	1,523	3,405	11,595	0,158	-0,046	-1,951
Pós Levo	17,226	19,662	19,980	23,160	1,113	2,489	6,194	0,127	0,211	-1,870
Pós DP Controole	10,191	17,061	17,710	22,073	2,046	4,575	20,933	0,268	-0,374	-1,661
Pós DP Genta	24,563	30,654	28,281	39,647	2,628	5,876	34,527	0,192	0,470	-1,648
Pós DP Lido	19,543	30,739	27,206	47,596	5,140	11,494	132,120	0,374	0,396	-1,823
Pós DP Bupi	13,296	14,474	14,890	15,316	0,404	0,903	0,816	0,062	-0,294	-2,111
Pós DP Levo	11,723	17,242	17,068	23,225	2,177	4,867	23,688	0,282	0,059	-2,067

ANEXO IV - Comparações múltiplas utilizando teste não paramétrico, considerando as diferenças entre as resistências mecânicas a compressão axial (MPa) dos subconjuntos e grupos estudados, sendo destacado em negrito as diferenças significativas.

Resistência mecânica

Subconjuntos	**n**	**Mediana**	***IC (95%)**	**Wilcoxon-Mann-Whitney P-valor**
Pré-teste	50	7,957	-26,118	**<0,001**
Pré-teste DP	50	32,25	-21,982	
Pós-teste	25	21,277	-2,625	0,464
Pós-teste DP	25	19,93	5,321	
Pré-teste	50	7,957	-15,134	**<0,001**
Pós-teste	25	21,277	-11,211	
Pré-teste DP	50	32,25	5,029	**0,001**
Pós-teste DP	25	19,93	16,25	
Grupos		**Mediana**	**IC (95%)**	**Wilcoxon-Mann-Whitney P-valor**
Pré Controle	10	6,513	-28,593	**<0,001**
Pré DP Controle	10	32,92	-24,532	
Pré Controle	10	6,513	-5,5396	**<0,001**
Pré Genta	10	10,222	-2,407	
Pré DP Controle	10	32,92	-17,202	**<0,001**
Pré DP Genta	10	48,001	-12,887	
Pré Genta	10	10,222	-39,09	**<0,001**
Pré DP Genta	10	48,001	-35,94	
Pré Controle	10	6,513	-1,755	0,089
Pré Lido	10	7,127	0,307	
Pré DP Controle	10	32,92	18,465	**<0,001**
Pré DP Lido	10	12,282	22,488	
Pré Lido	10	7,127	-6,463	**<0,001**
Pré DP Lido	10	12,282	-4,256	
Pré Controle	10	6,513	-1,961	**0,023**
Pré Bupi	10	7,759	-0,0949	
Pré DP Controle	10	32,92	-5,538	0,246
Pré DP Bupi	10	35,109	0,966	
Pré Bupi	10	7,759	-30,981	**<0,001**
Pré DP Bupi	10	35,109	-24,689	
Pré Controle	10	6,513	-3,512	**0,007**
Pré Levo	10	8,395	-0,468	
Pré DP Controle	10	32,92	2,422	**<0,001**
Pré DP Levo	10	28,324	7,707	
Pré Levo	10	8,395	-21,997	**<0,001**
Pré DP Levo	10	28,324	-17,283	
Pós Controle	5	30,147	-4,506	0,095
Pós DP Controle	5	17,710	29,212	
Pós Controle	5	30,147	-8,073	0,31
Pós Genta	5	21,277	25,645	
Pós DP Controle	5	17,710	-22,876	**0,008**
Pós DP Genta	5	28,281	-5,637	
Pós Genta	5	21,277	-18,371	**0,016**
Pós DP Genta	5	28,281	-2,601	
Pós Controle	5	30,147	-6,793	0,31
Pós Lido	5	18,412	28,51	
Pós DP Controle	5	17,710	-29,886	**0,032**
Pós DP Lido	5	27,206	-0,384	

Pós Lido	5	18,412	-29,184	0,151
Pós DP Lido	5	27,206	5,688	
Pós Controle	5	30,147	-8,251	0,31
Pós Bupi	5	21,456	25,466	
Pós DP Controle	5	17,710	-4,699	0,151
Pós DP Bupi	5	14,89	7,183	
Pós Bupi	5	21,456	2,302	**0,008**
Pós DP Bupi	5	14,89	10,779	
Pós Controle	5	30,147	-6,776	0,222
Pós Levo	5	19,98	26,942	
Pós DP Controle	5	17,710	-7,827	1
Pós DP Levo	5	28,324	8,207	
Pós Levo	5	19,98	-3,641	0,548
Pós DP Levo	5	28,324	8,913	
Pré Controle	10	6,513	-38,93	**<0,001**
Pós Controle	5	30,147	-7,63	
Pré DP Controle	10	32,92	-10,721	0,623
Pós DP Controle	5	17,710	16,943	
Pré Genta	10	10,222	-12,975	**<0,001**
Pós Genta	5	21,277	-8,102	
Pré DP Genta	10	48,001	10,153	**<0,001**
Pós DP Genta	5	28,281	22,632	
Pré Lido	10	7,127	-20,166	**<0,001**
Pós Lido	5	18,412	-7,837	
Pré DP Lido	10	12,282	-33,639	**<0,001**
Pós DP Lido	5	27,206	-8,049	
Pré Bupi	10	7,759	-17,409	**<0,001**
Pós Bupi	5	21,456	-9,991	
Pré DP Bupi	10	35,109	17,274	**<0,001**
Pós DP Bupi	5	14,89	25,126	
Pré Levo	10	8,395	-13,442	**<0,001**
Pós Levo	5	19,98	-8,814	
Pré DP Levo	10	28,324	5,698	**<0,001**
Pós DP Levo	5	28,324	16,646	

APÊNDICE

Prêmios e títulos

1. 2016- **Marcos Pinotti Barbosa:** Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos a base de Cimento Alpha-tricálcico, 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais.
2. 2015- Cimento alfa-fosfato tricálcico adicionado de fármacos: caracterização para fins de liberação controlada - **Melhor pôster**, 4 Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de tecidos e Órgãos Artificiais - Slabo.

Artigo completo publicados em periódico

1. COLPO, JULIO CESAR; PIGATTO, CAROLINE; ESCOBAR, CAMILA F.; DELBRÜCKE, TIAGO; JURADO, JOSE R.; SOUSA, VÂNIA CALDAS; SANTOS, LUIS ALBERTO. **Electrochemical Impedance Spectroscopy: Evaluation of Drug Delivery System of Alpha-Tricalcium Phosphate Cement**. Materials Science Forum (Online), v. 820, p. 293-296, 2015.

Artigo completo publicado em capítulo de livro

1. COLPO J.C.; PIGATTO, C.; Escobar, C.F.; DELBRUCKE, T.; Jurado, J.E.; SOUSA, V.C.; Santos, L.A. **Ceramics in Biomedicine**. Electrochemical Impedance Spectroscopy: Evaluation of Drug Delivery System of Alpha-Tricalcium Phosphate Cement. 1ed.: , 2015, v. 820, p. 293-296.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. COLPO J.C.; PIGATTO, C.; INGRASSIA, A.; Coelho, W. T. G.; Santos, L. A. **Cimento alfa-fosfato tricálcico adicionado de fármacos: caracterização para fins de liberação controlada**. In: 4 Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, João Pessoa. 4 Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de tecidos e Órgãos Artificiais, 2015.

2. COLPO J.C.; PIGATTO, C.; LUCENA, M. P. P.; Escobar, C. F.; DELBRUCKE, T.; Jurado, J. E.; SOUSA, V. C.; Santos, L. A. **Eletrochemical Impedance**

Spectroscopy: evaluation of drug delivery system of alfa tricalcium phosphate cement. In: 58º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2014, Bento Gonçálves. 58º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2014.

3. COLPO J.C.; PIGATTO, C.; DELBRUCKE, T.; Escobar, C. F.; Jurado, J. E.; SOUSA, V. C.; Santos, L. A. **Alpha-tricalcium phosphate cement: drug delivery system evaluation by eletrochemical impedance spectroscopy**. In: 8º Congresso Latino-americano de Órgãos Artificiais Biomateriais e Engenharia de Tecidos, 2014, Rosario. ALPHA-TRICALCIUM PHOSPHATE CEMENT: DRUG DELIVERY SYSTEM EVALUATION BY ELETROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY, 2014.

4. J. C. COLPO; MORAIS, E. C.; THUMER, M. B.; Coelho, W. T. G.; Santos, L. A. **Proposta de utilização do sistema de cimento ósseo a base de fosfato de cálcio como veículo de fármaco**. In: 57º Congresso Brasileiro de Cerâmica / 5º Congresso Iberoamericano de Cerâmica, 2013, Natal. 57º Congresso Brasileiro de Cerâmica / 5º Congresso Iberoamericano de Cerâmica, 2013.

Resumos publicados em anais de congressos

1. COLPO J.C.; MORAIS, E. C.; Thürmer, M. B.; Coelho, W. T. G.; Santos, L. A. **Cimentos ósseos a base de fosfato tricálcico (α-tcp) como veículo de fármacos: desenvolvimento, caracterização e avaliação com vistas à incorporação da tecnologia em vigilância sanitária**. In: VI Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária / II Simpósio Pan-americano de Vigilância Sanitária, 2013, Porto Alegre. VI SIMBRAVISA, 2013.

2. COLPO J.C.; INGRASSIA, A.; Santos, L. A. **Enfermagem e Engenharia de Materiais, parceria que gera tecnologia: cimento alfa-tricálcico X cimento alfa-tricálcico dupla pega**. In: 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2016, Foz do Iguaçu. 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2016.

3. COLPO J.C.; PIGATTO, C.; INGRASSIA, A.; Santos, L. A. **Sistema de liberação controlada de fármacos a base de cimentos apha-tricálcico**. In: 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2016, Foz do Iguaçu. 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2016.

4. COLPO J.C.; PIGATTO, C.; INGRASSIA, A.; Santos, L. A. **Caracterização das propriedades do Cimento Alpha-tricálcico utilizado como Veículo para Liberação Controlada de Fármacos**. In: 9º Congresso Latino_amaericano de órgãos artificiais e biomateriais, 2016, Foz do Iguaçu. 9º Congresso Latino_amaericano de órgãos artificiais e biomateriais, 2016.

5. COLPO J.C.; Santos, L. A. **Vigilância sanitária e engenharia de materiais: parceria gerando tecnologia**. In: 7º Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária, 2016, Salvador. 7º Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária, 2016.

Quadro resumo de conhecimentos publicados produzidos por meio desta tese

ANO	QUANTIDADE/ MEIO DE PUBLICAÇÃO			
	Resumo em anais	Artigo completo em anais	Artigo internacional	Trabalho premiado
2013	1	1		
2014	2	2		
2015	1	1	1	1
2016	4			1
2017			1 (prelo)	
TOTAL	**8**	**4**	**1 + 1 (prelo)**	**2**